



Karen Andreina Domingues Moniz

Efeitos da Glucosamina e Sulfato de Condroitina na
Osteoclastogénese Humana

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre
em Controlo de Qualidade, Área de Especialização em Fármacos e
Plantas Medicinais.

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor João
Miguel da Silva Costa Rodrigues (Faculdade de Medicina Dentária da
Universidade do Porto)

Co-orientação: Professora Doutora Maria Helena Raposo
Fernandes (Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do
Porto) e Professora Doutora Natércia Aurora Almeida Teixeira
(Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto).

Setembro de 2015

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, **Professor Doutor João Miguel Silva e Costa Rodrigues** (FMDUP) por todos os ensinamentos que me transmitiu, pela ajuda e disponibilidade, e ainda, pela compreensão manifestada ao longo desta etapa.

À **Professora Doutora Maria Helena Raposo Fernandes** (FMDUP), pelo acolhimento nesta instituição.

À **Professora Doutora Natércia Aurora Almeida Teixeira** (FFUP) pelo envolvimento neste projeto.

Ao **Professor Doutor Félix Carvalho** (FFUP), pelo aconselhamento e incentivo.

Ao **Pedro Martins** pela paciência, pelo apoio incansável e pelo exemplo de trabalho e dedicação que me inspira todos os dias.

À **Catarina Martins** e à **Carla Carvalho**, pela amizade e apoio incondicional.

À **Madalena Silva**, que apesar da distância se mantém sempre presente.

À minha família, principalmente à **Tata (Lindalva Domingues)**, ao meu irmão **David Moniz** e aos meus padrinhos, **António Sá Domingues** e **Patrícia Costanzo**, por tudo...

Resumo

A glucosamina e o sulfato de condroitina são dois fármacos vastamente utilizados na prevenção e tratamento de doenças que comprometem as articulações, como a osteoartrite. A sua ação é sobretudo direcionada à cartilagem articular, mais particularmente ao nível das células da cartilagem, os condrócitos, sendo-lhes reconhecidas propriedades anti-inflamatórias, anti-catabólicas e anabólicas *in vitro*, às quais se associa o seu efeito condroprotetor. Dada a estreita relação que existe entre o tecido cartilágneo e o tecido ósseo, é pertinente estudar os possíveis efeitos destes fármacos no metabolismo ósseo. O osso é um tecido altamente dinâmico em constante remodelação, que consiste no equilíbrio dinâmico entre reabsorção osteoclástica e síntese osteoblástica. O aumento da atividade osteoclástica, está associado a vários contextos patológicos, em que se verifica o comprometimento da integridade do tecido ósseo devido à sua destruição, como por exemplo a osteoartrite ou osteoporose.

Neste trabalho, testou-se o efeito da glucosamina e do sulfato de condroitina em culturas de células precursoras de osteoclastos, de forma a avaliar a diferenciação osteoclástica. As culturas foram mantidas na presença de glucosamina e sulfato de condroitina, de forma separada e em combinação, durante 21 dias,

As células foram caracterizadas aos dias 7, 14 e 21 através da quantidade proteica total, atividade e coloração histoquímica da TRAP. Posteriormente, a condição com maior efeito modulador foi tratada com inibidores das vias NF- κ B, MEK/ERK, JNK, p38, PKC e PGE₂, de forma a avaliar envolvimento destas vias de sinalização intracelulares na osteoclastogénese modulada pela glucosamina e pelo sulfato de condroitina. Os resultados revelam que o sulfato de condroitina inibiu a osteoclastogénese, enquanto que a glucosamina exerceu um efeito estimulador. Em combinação, estes fármacos potenciaram a osteoclastogénese. Verificou-se ainda que existem alterações nas diversas vias de sinalização intracelulares testadas.

Em conclusão, este trabalho revelou que a glucosamina e o sulfato de condroitina têm a capacidade de modular a osteoclastogénese, contribuindo para uma melhor compreensão dos efeitos destes fármacos no tecido ósseo saudável, servindo de base para delinear futuros estudos neste âmbito, visando apurar mais concretamente os seus efeitos no metabolismo ósseo.

Palavras-chave: remodelação; osteoclastogénese; osteoartrite; glucosamina; sulfato de condroitina.

Abstract

Glucosamine and Chondroitin Sulfate are two widely used drugs in the prevention and treatment of diseases that affects the joints, such as osteoarthritis. Its action is mainly directed to the articular cartilage, more particularly at the level of cartilage cells, the chondrocytes, with recognized *in vitro* properties such as anti-inflammatory, anti-catabolic and anabolic effects, which is associated with its chondroprotective effect. Given the close relationship between the cartilage tissue and bone tissue, it is pertinent to study the possible effects of these drugs on bone metabolism. Bone is a highly dynamic tissue constantly remodeled, in a balance between osteoclastic bone resorption and osteoblastic synthesis. Increased osteoclast activity is associated with several pathological contexts in which there is a loss of bone integrity due to destruction, such as osteoporosis or osteoarthritis.

In this study the effect of glucosamine and chondroitin sulphate in cell cultures of osteoclast precursors was tested, in order to assess their role on osteoclast differentiation. Cultures were maintained in the presence of glucosamine and chondroitin sulfate, separately and in combination, for 21 days.

Cells were characterized at days 7, 14 and 21 for total protein content, tartrate resistant acid phosphatase activity and histochemical staining. Subsequently, the condition with the highest osteoclastogenic modulation potential was treated with inhibitors of NF- κ B, MEK / ERK, JNK, p38, PKC and PGE2 pathways, in order to assess involvement of these intracellular signaling pathways in the osteoclastogenesis modulated by glucosamine and chondroitin sulfate. Results revealed that chondroitin sulfate inhibits osteoclastogenesis, while glucosamine exerted a stimulatory effect. In combination, these drugs potentiate osteoclastogenesis. It was also noted that there are various changes in the intracellular signaling pathways tested.

In conclusion, this study revealed that glucosamine and chondroitin sulfate have the ability to modulate osteoclastogenesis, contributing to a better understanding of the effect of these drugs on healthy bone tissue, providing the basis for outlining future studies in this area in order to determine more precisely its effects on bone metabolism.

Keywords: bone remodeling; osteoclastogenesis; osteoarthritis; glucosamine; chondroitin sulfate.

Índice

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
OBJETIVO	XIII
1 INTRODUÇÃO	14
1.1. O TECIDO ÓSSEO	15
1.1.1. MATRIZ INORGÂNICA	15
1.1.2. MATRIZ ORGÂNICA	15
1.1.3. CÉLULAS ÓSSEAS.....	16
1.1.3.1 OSTEÓBLASTOS	18
1.1.3.2 OSTEÓCITOS.....	18
1.1.3.3 OSTEÓCLASTOS	19
1.1.4 OSTEÓCLASTOGÊNESE	20
1.1.4.1 REGULAÇÃO DA OSTEÓCLASTOGÊNESE: O EIXO RANKL/RANK/OPG	22
1.1.4.2 COMUNICAÇÃO OSTEÓBLASTOS-OSTEÓCLASTOS	24
1.1.4.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO OSTEÓCLÁSTICA	25
1.2 PATOLOGIAS OSTEOARTICULARES	30
1.2.1 OSTEOPOROSE	30
1.2.1.1 FISIOPATOLOGIA.....	30
1.2.2 OSTEOARTRITE.....	33
1.2.2.1 FISIOPATOLOGIA.....	33
1.3 GLUCOSAMINA E SULFATO DE CONDRITINA	36
1.3.1 GLUCOSAMINA	36
1.3.2 SULFATO DE CONDRITINA	37
1.3.3 FARMACOCINÉTICA E BIODISPONIBILIDADE	37
1.3.4 AÇÃO BIOLÓGICA DA GLUCOSAMINA E SULFATO DE CONDRITINA	37
1.3.5 APLICABILIDADE CLÍNICA DA GLUCOSAMINA E SULFATO DE CONDRITINA.....	39
1.3.6 GLUCOSAMINA, SULFATO DE CONDRITINA E CÉLULAS ÓSSEAS	39
2 MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.1 CULTURAS CELULARES	43
2.1.1 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGUE PERIFÉRICO	43

2.1.2	CULTURA DE PBMC COM GLUCOSAMINA E SULFATO DE CONDRITINA	43
2.2	CARATERIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES.....	44
2.2.1	QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL	44
2.2.2	QUANTIFICAÇÃO DA ACTIVIDADE DA TRAP.....	44
2.2.3	COLORAÇÃO HISTOQUÍMICA DA TRAP	44
3	RESULTADOS.....	45
3.1	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOCLASTOGÉNICO DE GA E SC EM CULTURAS DE PBMC'S.....	45
3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS INTRACELULARES NA OSTEOCLASTOGÉNESE INDUZIDA PELA PRESENÇA DE GLUCOSAMINA E SULFATO DE CONDRITINA, EM CULTURAS DE PBMC.	51
4	DISCUSSÃO	56
5	CONCLUSÃO.....	65
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	66
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

Índice de figuras

Figura 1: BMU e o processo de remodelação	17
Figura 2: Representação esquemática de um osteoclasto em atividade de reabsorção .	20
Figura 3: Sistema RANKL /RANK /OPG	23
Figura 4: Sinalização osteoclástica	29
Figura 5: Ilustração esquemática da fisiopatologia da osteoporose	31
Figura 6: Mecanismo de ação dos estrogênios nas células ósseas.....	32
Figura 7: Mecanismo fisiopatológico da osteoartrite	35
Figura 8: Atividade e coloração histoquímica da TRAP em culturas de PBMC tratadas com GA e SC isoladamente em diferentes concentrações e em meio base.....	46
Figura 9: Atividade e coloração histoquímica da TRAP em culturas de PBMC tratadas com todas as combinações de GA e de SC, em meio base	47
Figura 10: Atividade e coloração histoquímica da TRAP em culturas de PBMC tratadas com GA e SC isoladamente em diferentes concentrações, em meio suplementado com fatores osteoclastogênicos	48
Figura 11: Atividade e coloração histoquímica da TRAP em culturas de PBMC tratadas com todas as combinações de GA e de SC, em meio contendo fatores osteoclastogênicos.....	50
Figura 12: Coloração histoquímica da TRAP aos dias 14 e 21, em culturas de PBMC em diferentes condições suplementadas com inibidores de vias de sinalização da osteoclastogênese, em meio base	54
Figura 13: Coloração histoquímica da TRAP aos dias 14 e 21 , em culturas de PBMC em diferentes condições suplementadas com inibidores de vias de sinalização da osteoclastogênese, em meio contendo fatores osteoclastogênicos	55

Índice de tabelas

Tabela 1 - Resumo dos trabalhos realizados <i>in vitro</i> com glucosamina e/ou sulfato de condroitina em células ósseas	40
Tabela 2 - Resumo dos trabalhos <i>in vivo</i> com glucosamina e/ou sulfato de condroitina em células ósseas.....	42
Tabela 3: Percentagem de inibição e desvio padrão aos dias 14 e 21, em culturas de PBMC suplementadas com inibidores de várias vias osteoclastogénicas, em meio base (BM).	51
Tabela 4: Percentagem de inibição e desvio padrão aos dias 14 e 21, em culturas de PBMC em meio com fatores osteoclastogénicos, suplementadas com inibidores de várias vias osteoclastogénicas.	52
Tabela 5: Perfil de envolvimento das vias de sinalização testadas na osteoclastogénese modulada pela glucosamina e sulfato de condroitina sozinhos e em combinação, em meio base e na presença de fatores osteoclastogénicos	53

Lista de abreviaturas

AINE's - anti-inflamatórios não esteróides

AP-1 - activator protein 1

ALP - fosfatase alcalina

BMP- bone morphogenetic proteins

BMU - *bone multicellular unit*

Cbfa1 - *core-bendigo factor family1*

COL1 - colagénio tipo 1

ERK - *extracellular signal-regulated kinase*

FGF - *fibroblast growth factor*

GA – glucosamina

GAG - glicosaminoglicano

HA - ácido hialurónico

IGF - *insulin like growth factor*

IL - interleucina

ITAM - *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

JNK - *c-Jun N-terminal kinase*

IKK - *IkB kinase*

MAPK - *mitogen activated protein kinases*

M-CSF - *macrophage colony stimulating factor*

MEK - *mitogen-activated protein kinase kinase*

MEKK - *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*

MITF - *microphthalmia-associated transcription factor*

MKK - *MAPK-related kinase*

MMP – metalloproteinase

MNC – *multinucleated cells*

NFATc1 - nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic calcineurin-dependent 1

NO - *nitric oxide*

OA - osteoartrite

OCN - osteocalcina

ONC - osteonectina

OP - osteoporose

OPG - osteoprotegerina

OPN – osteopontina

OSCAR - *osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor*

PBMC - *periferal blood mononucleated cells*

PGE2 - prostaglandina E2

PKC - *protein kinase C*

PTH - *parathyroid hormone*

PTHr - *parathyroid hormone receptor*

RANK - *receptor activator of nuclear factor κ B*

RANKL - *receptor activator of nuclear factor κ B ligand*

SP - sialoproteína óssea

SC - sulfato de condroitina

SG - sulfato de glucosamina

TNF- fator de necrose tumoral

TGF β - *transforming growth factor β*

TRAF - tumor necrosis factor *receptor associated factor*

TRAP - *tartarate-resistente acid phosphatase*

VNR - vitronectina

Objetivo

Glucosamina e Sulfato de Condroitina são dois fármacos muito utilizados em todo o mundo pelos doentes com osteoartrite. Diversos estudos *in vitro* reconhecem a estes fármacos propriedades anti-inflamatórias, modificadoras da estrutura articular e retardadoras da doença, no entanto, estudos que relacionem estes fármacos com o metabolismo ósseo são escassos. A osteoclastogénese é um processo fundamental para a manutenção da homeostasia e equilíbrio da estrutura e metabolismo ósseos. Desarranjos nesta atividade perturbam o equilíbrio da remodelação óssea, favorecendo a atividade de reabsorção, o que está na origem de várias doenças que afetam o tecido ósseo e que comprometem a sua integridade.

No presente trabalho pretende-se testar os efeitos Glucosamina e Sulfato de Condroitina na osteoclastogénese humana e caracterizar os mecanismos intracelulares envolvidos, no sentido de esclarecer acerca dos possíveis efeitos no tecido ósseo associados à administração destes dois fármacos, traçando um perfil das vias de sinalização envolvidas na osteoclastogénese induzida por estes fármacos.

1 Introdução

Apesar do seu carácter rígido, o tecido ósseo é altamente dinâmico, sendo continuamente modelado e reparado. Este processo contínuo de reparação é chamado de remodelação óssea, e consiste no equilíbrio dinâmico entre reabsorção levada a cabo pelos osteoclastos, e síntese, mediada pelos osteoblastos [1]. A remodelação garante a manutenção da microarquitetura óssea, através da reparação de danos, adaptação da estrutura óssea à carga a que tecido é submetido, e permite a regulação da libertação de cálcio e outros iões em resposta às necessidades do organismo [2]. No osso saudável, as actividades osteoclástica e osteoblástica encontram-se coordenadas e equilibradas. Desajustes no equilíbrio dinâmico de reabsorção e síntese, levam a perturbações na estrutura e função deste tecido, estando na origem de várias patologias que afetam a estrutura e metabolismo ósseos [3]. Grande parte das alterações patológicas que afetam o tecido ósseo, têm na sua origem o excesso de reabsorção osteoclástica. São exemplo dessas alterações a osteoporose, osteoartrite ou metástases ósseas [4]. O processo de diferenciação e activação dos osteoclastos, a osteoclastogénese, tem vindo a ganhar uma crescente importância no contexto da caracterização detalhada no metabolismo ósseo. A identificação dos factores envolvidos na regulação deste processo tem sido um ponto fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens experimentais e terapêuticas. Dois dos factores mais importantes na osteoclastogénese são o M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) e o RANKL (*receptor activator of nuclear factor kB ligand*) [5], suficientes para promover osteoclastogénese *in vitro*. A caracterização da principal via implicada neste processo, a via NF- κ B (*nuclear factor kappa-B*) [6] e os factores que intervêm na sua regulação, RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa-B*), RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) e OPG (*Osteoprotegerin*), são cruciais para compreender o processo de diferenciação osteoclástica [7].

1.1. O Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo que assume funções de carácter mecânico e metabólico. Este permite o suporte estrutural, locomoção e confere protecção aos órgãos, funcionando, por outro lado, como um reservatório de iões, importantes na manutenção da homeostasia metabólica do organismo [8]. É constituído, essencialmente por uma matriz e células ósseas.

A matriz óssea tem um carácter bifásico, contendo uma fase inorgânica, que representa cerca de 60% do tecido, e uma fase orgânica, que representa cerca de 30% [9]. É da associação do componente orgânico e inorgânico que advêm as propriedades biomecânicas deste tecido, permitindo-lhe ser resistente e ao mesmo tempo flexível na absorção das forças de impacto [10]. Para além da matriz, este tecido contém ainda vários tipos de células, responsáveis pelos processos dinâmicos que ocorrem neste tecido.

1.1.1. Matriz Inorgânica

Na fase inorgânica ou mineralizada da matriz óssea, encontram-se depósitos de cálcio e fósforo sob a forma de cristais de hidroxiapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, o maior componente dos tecidos rígidos como ossos e dentes. Outros iões como Na, Si e Mg estão também presentes, mas em menor proporção [10] [9].

1.1.2. Matriz Orgânica

A fase orgânica é predominantemente constituída por fibras de colagénio tipo I (COL1), constituindo cerca de 90% do total de proteínas [11]. A matriz orgânica atua como uma importante base molecular estrutural, servindo de molde à deposição de componente inorgânico[10]. Existem ainda outros constituintes minoritários que estão presentes na matriz orgânica:

- Proteoglicanos

Estas moléculas são formadas pela ligação covalente de uma proteína a um ou mais polissacarídeos de cadeia longa, os glicosaminoglicanos (GAG). Os GAG são constituídos por unidades repetidas de dissacarídeos, podendo apresentar vários níveis de sulfatação. Entre os principais GAG, figuram o sulfato de condroitina (SC), sulfato de queratano (SQ), sulfato de dermatano (SD), heparina (HP) e ácido hialurónico (HA). O

último não se encontra sulfatado nem associado a proteínas. Estas GAG, encontram-se também presentes na matriz orgânica da cartilagem [12] [10].

- **Proteínas não Colagénicas**

Estão essencialmente envolvidas na regulação da mineralização da matriz e na proliferação das células ósseas, sendo a maioria produzidas pelos osteoblastos [13]. PBB. Entre elas, destacam-se a fosfatase alcalina (ALP), principal marcador de diferenciação dos osteoblastos e importante na mineralização, Osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (SP) e osteonectina (ONC).

- **Fatores de crescimento**

Durante a síntese de material ósseo, os osteoblastos produzem fatores que ficam depositados na matriz, como IGF (*Insulin-like Growth Factor*), TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*) ou BMP's (*Bone Morphogenetic Proteins*). Estes fatores são posteriormente libertados durante a reabsorção óssea, regulando o processo de síntese mineral [14].

1.1.3. Células Ósseas

Entre os elementos celulares do tecido ósseo figuram vários tipos de células:

- **Osteoclastos**, as células exclusivamente responsáveis pela reabsorção.
- **Osteoblastos**, que sintetizam a matriz extracelular.
- **Osteócitos**, que se encontram embebidos na matriz e detetam danos ou alterações desta.

Uma vez formado, o osso vai sendo remodelado, ou seja, reabsorvido e novamente formado, em resposta a diversos estímulos a que está sujeito. A remodelação *in vivo* ocorre pela atividade coordenada das células ósseas, em áreas bem delimitadas, as chamadas *Bone Multicellular Units* (BMU) (Figura 1). Estas são unidades funcionais temporárias tridimensionais, descritas pela primeira vez por Frost há várias décadas [15], que relacionam a atividade das células ósseas no espaço e no tempo. Para além das células ósseas, encontram-se ainda células do sistema imunitário, elementos vasculares, hormonas, citocinas e fatores de crescimento [1]. Na zona mais superficial, permanecem as células de revestimento que se encontram num estado quiescente, tendo a capacidade de se diferenciar em osteoblastos e osteócitos [16].

A remodelação é um processo essencial à manutenção da microarquitetura óssea e à qualidade funcional do tecido, e consiste fundamentalmente no equilíbrio dinâmico entre o processo de reabsorção levado a cabo pelos osteoclastos, e sucessiva formação de tecido ósseo, dirigida pelos osteoblastos [13]. Os propósitos da remodelação são de ordem diversa, podendo ter um carácter sistémico, que visa garantir a manutenção das concentrações de cálcio e fosfato em circulação, assim como a adaptação à carga a que o osso é submetido, reduzindo o risco de danos e fraturas. Por outro lado, a reparação dos danos da matriz é um processo de carácter localizado, e visa reparar danos em locais específicos [7, 17].

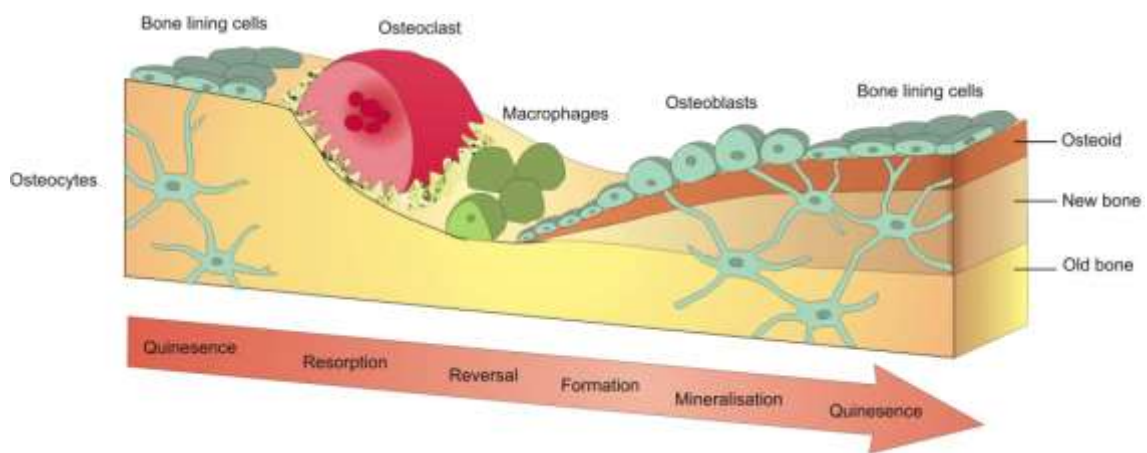


Figura 1: BMU e o processo de remodelação [18].

A remodelação envolve diferentes etapas sequenciais que formam o ciclo de remodelação: Em primeiro, os precursores osteoclasticos são recrutados para o local de reabsorção em resposta a estímulos específicos, diferenciando-se em osteoclastos maduros, onde aderem à matriz e iniciam a sua ação lítica. Na fase de reversão, a atividade osteoclástica cessa, enquanto que os precursores osteoblásticos se diferenciam, iniciando-se a atividade de síntese de matriz mineralizada. Após a fase ativa de mineralização, o tecido permanece num estado quiescente.

1.1.3.1 Osteoblastos

Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação de tecido ósseo, sintetizando a matriz orgânica e regulando a sua mineralização, concentrando cálcio e fosfato através de vesículas ligadas à membrana [19]. Ao longo da diferenciação osteoblástica, algumas macromoléculas vão sendo expressadas, sendo frequentemente utilizadas como marcadores específicos. Entre elas a ALP, assim como várias proteínas da matriz: COL-1, OCN, OPN e SP [20].

Os osteoblastos descendem de células mesenquimais indiferenciadas. Uma vez presentes os estímulos apropriados, ocorre o comprometimento das células mesenquimais em células osteoprogenitoras. É através de uma complexa etapa de proliferação e diferenciação que as células osteoprogenitoras se transformam em pré-osteoblastos, e sequencialmente em osteoblastos maduros, adquirindo uma forma que passa de fusiforme a cubóide, capacidade de sintetizar matriz, tornando-se altamente positivos para a ALP [13, 21]. Após o período ativo, são três os destinos possíveis para estas células: sofrer apoptose, passar a um estado quiescente ou ficar aprisionados na matriz, diferenciando-se em osteócitos [22].

1.1.3.2 Osteócitos

Os osteócitos são as células mais abundantes no tecido ósseo e encontram-se em lacunas no interior da matriz. Estas apresentam vários prolongamentos citoplasmáticos que estabelecem uma rede comunicante que se expande no interior da matriz através de canaliculos, trocando informação através de junções comunicantes (*gap junctions*) [23] [24]. A sua localização e o seu elevado número, conferem-lhe grande vantagem naquele que é o seu principal papel que é captar e reportar os danos da matriz, funcionando no tecido ósseo como células mecanossensoras [25]. Desta forma, têm um papel crucial na manutenção da integridade da matriz óssea, regulando intimamente os mecanismos que levam ao início da remodelação. Os sinais captados pelos osteócitos são encaminhados para as células de revestimento, com as quais comunicam através do sistema canalicular, que vão desencadeiam o recrutamento dos meios necessários para que se inicie o ciclo de remodelação.

1.1.3.3 Osteoclastos

Os osteoclastos são as células especializadas na reabsorção e, ao contrário dos osteoblastos e dos osteócitos, não descendem de células osteoprogenitoras, mas sim de células sanguíneas, partilhando com estas células os seus precursores. As PBMC (*Peripheral Blood Mononucleated Cells*), estão presentes na medula óssea, baço e na circulação periférica, e são uma população heterogênea que envolve linfócitos e monócitos/macrófagos [26] [5]. Os precursores osteoclásticos provêm da fração de monócitos/macrófagos CD14⁺ desta população [27]. Os osteoclastos formam-se pela fusão dos seus precursores mononucleados e posterior diferenciação em células osteoclásticas maduras.

Os osteoclastos maduros são células gigantes, multinucleadas, altamente especializadas na reabsorção da matriz óssea. Para tal, estas células desenvolvem uma complexa e eficaz maquinaria celular, que lhes permite desempenhar uma série de atividades necessárias para que ocorra reabsorção [28]. Estas células observam-se tipicamente na zona mais afastada da superfície óssea, para onde são recrutados os seus precursores através da circulação periférica, onde se diferenciam em células maduras multinucleadas, um processo denominado osteoclastogénese.

A ativação dos osteoclastos inicia-se com a sua adesão à matriz óssea. Uma vez ativadas, estas células sofrem uma série de transformações que lhes permitirá adquirir as características necessárias para a sua atividade de reabsorção (Figura 2). Transformam-se em células altamente polarizadas, com uma reorganização do citoesqueleto, desenvolvendo diferentes domínios a nível da sua membrana. A adesão à matriz ocorre através de estruturas especializadas chamadas podossomas, que criam uma zona de selagem, *sealing zone*, que servirá para a criação de um microambiente estanque que separa o local de reabsorção das regiões adjacentes, salvaguardando a sua integridade [1]. A criação deste microambiente é conseguida a partir do rearranjo das fibras de actina que formam os anéis de actina juntamente com integrinas $\alpha\beta3$, o recetor da vitronectina (VNR) [29]. Os osteoclastos desenvolvem ainda uma área ondulada da sua membrana que é o resultado da fusão de vesículas lisossomais secretoras, a chamada *ruffled border*, através da qual é secretado HCL pelas bombas H⁺ATPase, e canais de Cl⁻. Consequentemente, ocorre uma acidificação do compartimento de reabsorção para um pH de aproximadamente 4.5, permitindo a dissolução da fase mineral [6] [30]. A acidificação mobiliza o componente mineral, expondo a matriz orgânica, maioritariamente constituída por COL-1, que será degradada por enzimas líticas, produzidas pelos

osteoclastos, como a catepsina K, TRAP (*Tartrate-Resistente Acid Phosphatase*), MMP (Metaloproteinases) e gelatinase [31] [28].

Os produtos de degradação são incorporados pelos osteoclastos em vesículas e posteriormente libertados para o espaço extracelular [32].

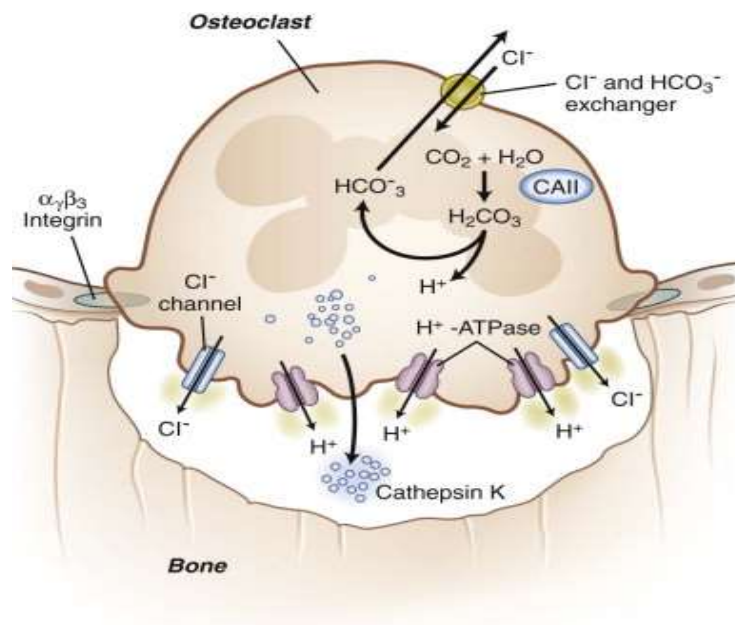


Figura 2: Representação esquemática de um osteoclasto em atividade de reabsorção [33].

Os osteoclastos aderem à superfície óssea através dos podossomos que contêm integrinas $\alpha_v\beta_3$, criando-se uma lacuna de reabsorção (Lacuna de Howship). No interior do osteoclasto, a anidrase carbônica (CAII) promove a conversão de gás carbônico (CO_2) e água (H_2O) em íons hidrogênio (H^+) e carbonato (HCO_3^-). A bomba de prótons ATPase localizada na *ruffled border*, promove a libertação de íons H^+ e consequente acidificação da lacuna e desmineralização da matriz. A parte orgânica da matriz é digerida por enzimas líticas como a catepsina K.

1.1.4 Osteoclastogénese

A osteoclastogénese consiste no processo de formação, desenvolvimento e maturação dos osteoclastos, o que requer um conjunto de etapas, das quais se destaca a fusão dos seus precursores mononucleados [26]. As células hematopoiéticas diferenciam-se em osteoclastos na sequência do seu recrutamento para os locais de reabsorção, onde, através da ação de diversos fatores locais e sistêmicos ocorrerá a diferenciação dos precursores mononucleados em pré-osteoclastos mononucleados e sua sucessiva fusão, originando uma célula ativa multinucleada [5].

Um significativo avanço na compreensão do processo de diferenciação e ativação dos osteoclastos foi possível após a descoberta dos dois fatores osteoclastogênicos necessários e suficientes para a indução de osteoclastogênese *in vitro*. Esta descoberta verificou-se utilizando co-culturas de células da medula óssea ou do baço e células do estroma, sugerindo que fatores provenientes das células do estroma estariam na origem deste processo. Os dois fatores identificados são o M-CSF e RANKL [5]. Estes fatores, produzidos pelas células da linha osteoblástica, vieram abrir novas perspectivas no estudo da osteoclastogênese, pois, até então, a osteoclastogênese induzida em laboratório só era possível num sistema de co-cultura osteoclastos-osteoblastos. Vários estudos demonstraram que é possível originar osteoclastos viáveis *in vitro* através da suplementação dos meios de cultura com estes dois fatores. Porém, este processo é claramente mais complexo *in vivo*.

O papel do M-CSF foi descoberto através de experiências realizadas com ratinhos com osteopetrose cuja região codificante da proteína M-CSF se encontrava alterada [34]. Células hematopoiéticas quando cultivadas com osteoblastos provenientes destes ratinhos não se diferenciavam em osteoclastos na presença de vitamina D, tendo a adição de M-CSF à co-cultura restaurado a diferenciação osteoclástica [35].

O M-CSF é uma glicoproteína homodimérica, cujas subunidades estão ligadas covalentemente por ligações dissulfureto. É produzido por osteoblastos, monócitos, granulócitos, células endoteliais, fibroblastos, linfócitos B e T e por algumas linhas celulares tumorais quando activadas, e interage com o seu recetor c-fms presente na membrana dos precursores osteoclásticos [6]. O M-CSF é fundamental nas primeiras etapas de diferenciação dos precursores osteoclásticos, contribuindo para a sobrevivência das células da linhagem de macrófagos e osteoclastos, assim como para a fusão e proliferação dos precursores osteoclásticos [36]. Um dos efeitos mais imediatos do M-CSF é promover a expressão do recetor RANK nos precursores mielóides. O M-CSF promove ainda a sobrevivência dos precursores osteoclásticos e à semelhança do RANKL, promove aspectos relacionados com a sua função [37].

O RANKL é uma proteína transmembranar do tipo I pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF). Ratinhos que não expressam esta proteína apresentam osteopetrose grave devido à incapacidade de formar osteoclastos, revelando o seu indispensável papel na osteoclastogênese [38]. O RANKL é produzido por diversas células, incluindo osteoblastos, fibroblastos e linfócitos T ativados e células da medula

óssea [39]. Diversos fatores autócrinos e parácrinos contribuem para o aumento da sua expressão, tais como PTH (*parathyroid hormone*), PGE2 e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 (interleucina-1), IL-11 (interleucina-11) e TNF- α , estimulando a osteoclastogênese. [11] [40]. O RANKL é reconhecido pelo seu recetor RANK (*receptor activator of nuclear factor κ B*), expressado à superfície dos precursores osteoclásticos[41]. Esta ligação ligando-recetor vai induzir a diferenciação e activação dos osteoclastos, despoletando uma série de cascatas de sinalização que culminam na expressão de genes característicos dos osteoclastos [39].

1.1.4.1 Regulação da Osteoclastogénese: o eixo RANKL/RANK/OPG

O conhecimento e compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a atividade dos osteoclastos sofreu um considerável avanço, após a descoberta nos anos 90, do eixo de regulação RANKL/RANK/OPG, em simultâneo com estudos realizados em ratinhos geneticamente modificados [30].

A atividade do RANKL pode ser antagonizada pela presença de um *decoy receptor* denominado OPG (Osteoprotegerina), que funciona como um regulador negativo da osteoclastogénese. A OPG foi identificada inicialmente como um fator bloqueador da osteoclastogénese *in vitro* e a reabsorção óssea *in vivo* [42] [43]. Este é um fator solúvel, membro da família TNF, que forma um complexo com o RANKL, impedindo a ligação ao seu recetor RANK nos precursores osteoclásticos, inibindo assim a diferenciação osteoclástica [44].

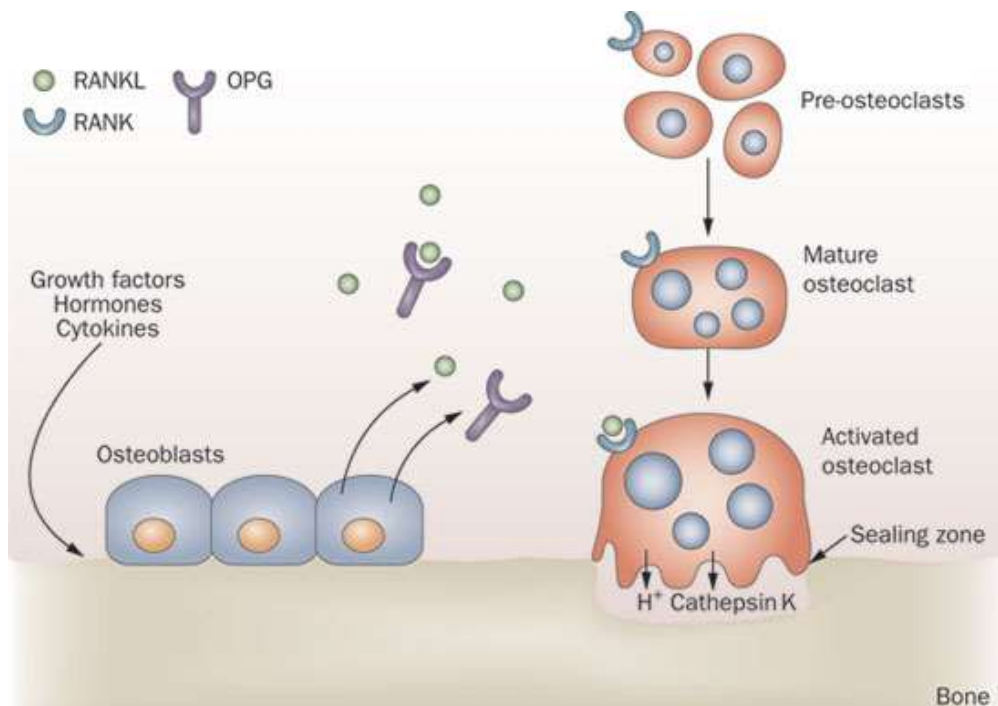


Figura 3: Sistema RANKL /RANK /OPG [45].

A ligação do RANKL ao seu recetor RANK nos pré-osteoclastos, ativa a osteoclastogénese. A OPG opõe-se a esse processo, ligando-se especificamente ao RANKL, impedindo a sua ligação ao seu recetor

A sobreexpressão de OPG favorece a inibição da função osteoclástica e consequente inibição da reabsorção, estando associada a contextos patológicos como osteopetrose ou doença de Paget, enquanto a sua deleção está associada a fenótipos que implicam um aumento da reabsorção, como a osteoporose [46] [47].

A OPG é produzida pelos osteoblastos, em resposta a agentes anabólicos, como estrogénios, TGF- β (Transforming Growth Factor- β) ou BMP's. A sua expressão é regulada não apenas por citocinas, hormonas e fatores de crescimento, mas também pela Wnt/ β -catenina, uma via que regula a formação óssea levada a cabo pelos osteoblastos, e o comprometimento das células mesenquimais com o fenótipo osteoblástico [7].

A maioria dos fatores que induzem a expressão de RANKL também regula a expressão de OPG [48]. O rácio RANKL/OPG altera-se a favor ou de forma oposta à osteoclastogénese, dependendo da expressão de cada um dos fatores envolvidos, representando um indicador importante da osteoclastogénese e, consequentemente, do estado metabólico do tecido ósseo. O rácio RANKL/OPG é, por isso, crítico na regulação da atividade osteoclástica [7].

As células da linha osteoblástica podem controlar, desta forma, o desenvolvimento da atividade osteoclástica em resposta a estímulos de natureza diversa (mecânicos, hormonais, inflamatórios) adaptando os níveis da expressão de RANKL e OPG num eixo de regulação comum, conhecido como eixo RANK/RANKL/OPG.

1.1.4.2 Comunicação Osteoblastos-Osteoclastos

A atividade das células ósseas é altamente coordenada e interdependente, pelo que o papel de um tipo de célula não pode ser isolado, do ponto de vista funcional, devendo ser encarado como parte de um processo altamente dinâmico, e cujas interações influenciam a atividade das restantes células e, portanto, todo o processo de remodelação.

Os osteoclastos não são apenas simples células de reabsorção, estas são parte importante de todo o metabolismo ósseo, estando envolvidas na modulação das funções dos osteoblastos, positiva e negativamente [49, 50]

A remodelação óssea é definida através da atividade conjunta de osteoblastos e osteoclastos. De facto, existem várias situações em que um aumento da reabsorção osteoclástica está associado a um aumento da atividade osteoblástica. A reabsorção osteoclástica reduz a massa óssea, mas também requer uma subsequente formação óssea levada a cabo pelos osteoblastos [51].

São várias as interações que as células ósseas estabelecem entre si, através de contacto célula a célula ou através de fatores paracrínicos.

A activação da formação osteoblástica pelos osteoclastos, é um passo crítico no metabolismo ósseo, podendo ocorrer independentemente do contacto célula-a-célula. Está bem estabelecido o papel fundamental das células da linha osteoblástica na diferenciação, activação e função osteoclásticas, através da expressão dos dois fatores fundamentais para este processo, M-CSF e RANKL, produzindo ainda um regulador negativo fundamental da osteoclastogénese, o OPG. Adicionalmente, as células alvo de vários fatores que estimulam a osteoclastogénese *in vitro*, como PGE-2, PTH, Vitamina D, IL-11, são, na verdade, as células da linha osteoblástica [52]. Para além desta comunicação osteoblastos-osteoclastos, parece claro que o fluxo de comunicação celular que ocorre nas BMU se dá também no sentido oposto, tendo os osteoclastos influência, direta e indirecta, nos processos que ocorrem nas células osteoblásticas [53].

A activação da fase de síntese óssea é uma etapa chave no processo de remodelação. Nesta fase ocorre o chamado *coupling*, ou activação da fase de formação osteoblástica pelos osteoclastos, que pode ocorrer independentemente do contacto célula a célula [54]. Na fase de reabsorção óssea, à medida que os osteoclastos vão digerindo a matriz, são libertados fatores presentes nesta, como TGF- β , BMP's e IGF-II, que se sabe estarem envolvidos na diferenciação osteoblástica, activando assim a fase de formação [54].

Por outro lado, os osteoblastos reconhecem alguns fatores presentes nos locais de reabsorção deixados pelos osteoclastos, na ausência destes. Outros estudos sugerem ainda que a TRAP existente nas lacunas de reabsorção pode estimular a atividade de formação óssea [55, 56]

O contacto célula-a-célula é também um ponto fundamental na comunicação osteoclastos-osteoblastos. Neste tipo de troca de informação, ocorre uma sinalização bidirecional, através da interacção de ligando e receptores Ephrin/ Eph. As células ósseas como osteoblastos, condrócitos ou osteoclastos expressam uma série de ligandos Ephrin e seus receptores. A molécula EphrinB2, expressada pelos osteoclastos, atua através do seu recetor EphB4 expressado nos osteoblastos, promovendo a diferenciação osteoblástica. Nesta interacção ocorre uma sinalização bidireccional. A sinalização reversa através da ephrinB2, vai suprimir a diferenciação osteoclástica enquanto que a sinalização no sentido direto (osteoclasto-osteoblasto) favorece a sua ativação e diferenciação [40] [57]. Esta interação facilita a transição da fase de reabsorção para a fase de formação.

1.1.4.3 Vias de Sinalização Osteoclástica

O comprometimento, diferenciação e função osteoclásticas, requerem o estabelecimento de um perfil específico de expressão de genes, que resulta da atividade de uma vasta rede de vias de sinalização.

A descoberta do RANK e RANKL veio contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos. Estudos com ratinhos com osteopetrose geneticamente modificados foram uma importante fonte de informação relativamente ao papel de moléculas como RANK, RANKL e M-CSF. A activação do recetor osteoclástico RANK pelo seu ligando RANKL é

o acontecimento a partir do qual se desencadeiam várias cascatas de sinalização que levam à expressão de genes específicos dos osteoclastos [5] [58].

No início do comprometimento osteoclástico, os precursores mielóides diferenciam-se em precursores osteoclásticos pela ação de uma série de fatores de transcrição, incluindo o PU.1 ou MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*). Estes fatores estão implicados na expressão do gene CSF1R, que codifica o recetor do M-CSF nos precursores osteoclásticos e que permitirá a ligação do M-CSF e, conseqüentemente, a sua sobrevivência [29].

O RANK não possui atividade enzimática intrínseca, pelo que a indução da sua atividade depende do recrutamento e ativação de proteínas da família das TRAF (*tumor necrosis factor receptor associated factor*), que são proteínas de adaptação que permitem o recrutamento de outras proteínas a jusante. Este é um passo preliminar chave na sinalização através do RANK. Existem três domínios de ligação intracelular na molécula de RANK para as TRAF-2, 5 e 6. Ratinhos com deficiência nas TRAF-2 e TRAF-5 não apresentam malformações relevantes a nível esquelético [59], o que sugere que estas podem ter um papel complementar neste processo. Por sua vez, ratinhos com deficiência na expressão de TRAF-6 apresentam osteopetrose grave, demonstrando que esta é uma molécula essencial que funciona como um adaptador chave na sinalização via RANK [60] [61].

A ligação da TRAF-6 ao RANK, ativa a via NF- κ B e as MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), culminando na expressão do mais importante fator de transcrição implicado na osteoclastogénese, o NFATc1 (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1) [58].

NFATc-1, é o fator de transcrição mais fortemente induzido na diferenciação osteoclástica através do RANK [62] [51]. Este promove a expressão de genes responsáveis por características osteoclásticas como adesão, migração, acidificação e degradação da matriz orgânica e inorgânica [63].

Células embrionárias NFATc1^{-/-} não se diferenciam em osteoclastos. Adicionalmente, a expressão ectópica deste fator provocou a diferenciação de precursores provenientes da medula em osteoclastos [64]. A sua activação mediada pela interação RANK-RANKL, é dependente da via NF- κ B [65], envolvendo também fatores como o c-Jun, c-Fos e p38. [3].

O fator de transcrição NFATc1 encontra-se associado a outros fatores de transcrição como o AP-1 (*activator protein 1*), PU.1 e MITF. Este complexo de fatores de transcrição é responsável pela expressão dos genes específicos dos osteoclastos.

A via NF- κ B é a via mais notável na osteoclastogênese via RANK. O NF- κ B é uma família de fatores de transcrição que reconhecem uma sequência comum de DNA chamada κ B. Nos mamíferos existem cinco proteínas NF- κ B, sendo as NF- κ B1 (p50) e NF- κ B2 (p52) essenciais na osteoclastogênese [66]. Apesar de ratinhos com deficiência na p50 ou p52 não apresentarem problemas relevantes a nível ósseo, ratinhos duplamente deficientes nestas duas proteínas desenvolvem osteopetrose devido a problemas na osteoclastogênese, indicando o papel crítico da associação das proteínas p50 e p52 neste processo.[67]. O complexo proteico NF- κ B permanece no citoplasma ligado a um inibidor, o I κ B, estando assim na sua forma inativa. A ativação desta via ocorre através da fosforilação das proteínas inibidoras I κ B, pelo complexo IKK (*I κ B kinase*), permitindo que o NF- κ B ativado seja translocado para o núcleo. Uma vez no núcleo, este contribuirá para a expressão de genes característicos dos osteoclastos, através da indução do NFATc1 [6] [61]. O NF- κ B contribui diretamente para a indução do NFATC1 e indiretamente, através da indução do c-Fos [68].

As MAPK são uma família de proteínas que estão envolvidas em processos celulares como expressão génica, mitose, diferenciação, sobrevivência e apoptose [69]. Estas encontram-se em módulos que contêm três tipos de proteínas, as MAPK, MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*), e MEKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) ou Raf, transmitindo sinais por fosforilações hierarquicamente sequenciais, terminando na regulação da expressão génica [70]. Entre as várias vias MAPK, destacam-se a via p38, a via JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e a via ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) [71, 72]. A p38 e a JNK são vias induzidas por fatores desencadeadores de stress celular, enquanto que as ERK são ativadas, sobretudo por sinais mitogénicos ou fatores de crescimento.

As MAPK têm um papel importante na osteoclastogênese modulando a atividade do fator de transcrição AP-1. Este é um fator de transcrição que forma uma proteína heterodimérica constituída pelo c-Fos e c-Jun. Uma vez ativado e translocado para o núcleo, liga-se a uma sequência específica de DNA, levando à expressão de genes osteoclásticos. Este fator é essencial na osteoclastogênese [51, 73].

A p38 é ativada através da fosforilação por ação da MKK6 (*MAPK-related kinase-6*), resultando na fosforilação e ativação do fator de transcrição MITF, essencial, não só no

comprometimento dos precursores osteoclásticos, como também na diferenciação terminal dos osteoclastos, controlando a expressão de genes que codificam a TRAP e CATK [74].

As JNK são induzidas por condições de stress e sinais inflamatórios, como as citocinas IL-1 β , TNF- α e activadas pelas MKK4 e MKK7 [75], sendo responsáveis pela fosforilação do c-Jun [69], e consequente activação do fator de transcrição AP-1. Pensa-se que a via JNK/c-Jun possa estar relacionada com a regulação da apoptose nos osteoclastos através da activação do RANK [76].

A ERK é uma via que se pensa estar associada à regulação negativa da osteoclastogénese, pois a inibição da sua atividade através inibidores da MEK1 e 2, PD98059 e U0126 respetivamente, demonstrou potenciar a osteoclastogénese induzida pela via RANK [77]. No entanto, vários estudos demonstram que esta via desempenha um importante papel na sobrevivência dos osteoclastos, pensando-se que possa estar envolvida em processos como a polarização e formação de domínios da membrana relacionados com a atividade dos osteoclastos [78, 79].

A ativação do NFATc1 ocorre também através de uma via co-estimulatória dependente da oscilação da concentração de Ca²⁺ intracelular. Nesta via, o recetor ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), que intervém na ativação da sinalização dependente do cálcio em células imunitárias, tem um papel fundamental [58]. O OSCAR (*osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor*) é uma imunoglobulina que funciona como recetor nos osteoclastos, envolvido na interacção célula a célula entre osteoclastos e osteoblastos. Este recetor associa-se a uma molécula adaptadora (FcR γ) que acolhe o imunorecetor ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), que por sua vez leva à ativação da via dependente do cálcio. Em resposta às oscilações de cálcio, este liga-se à calmodulina que vai sofrer uma alteração conformacional, induzindo a activação, a jusante, das CaMKs (*calcium/calmodulin- activated kinases*), assim como da fosfatase calcineurina [62]. O NFATc1 é então desfosforilado e translocado do citoplasma para o núcleo, iniciando-se a fase de transcrição [63].

Para além da ativação da calcineurina na via co-estimulatória do NFATC1, o Ca²⁺ é responsável pela ativação das PKC (*protein kinase C*), que, quando ativada, induz a proliferação dos osteoclastos [39].

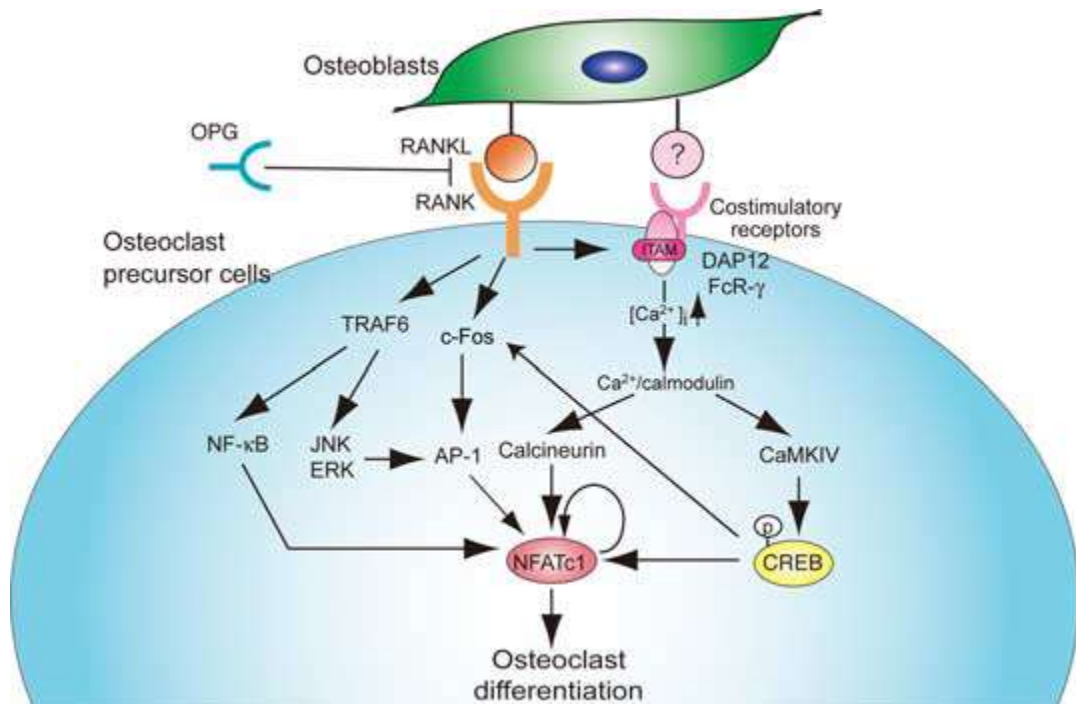


Figura 4: Sinalização osteoclástica [62].

A ligação do RANKL ao seu recetor nos precursores osteoclásticos resulta no recrutamento de moléculas adaptadoras, TRAF, que ativa a via NF-κB e as MAPK. A indução do principal fator de transcrição na osteoclastogénese, NFATc1, está dependente de outros fatores de transcrição com AP-1, que contem c-Fos e c-Jun, PU.1 e MITF, que induzem vários genes específicos dos osteoclastos.

1.2 Patologias Osteoarticulares

O equilíbrio entre a atividade osteoblástica e osteoclástica é fundamental para a manutenção da integridade do tecido ósseo. Assim, qualquer alteração na atividade destas células terá um impacto negativo neste tecido. Diversas patologias têm sido associadas à alteração na atividade e no número de osteoclastos, caracterizando-se por um excesso de reabsorção. São exemplo dessas patologias a osteoartrite e a osteoporose, em que a excessiva atividade osteoclástica desempenha um papel central na sua fisiopatologia.

1.2.1 Osteoporose

A osteoporose (OP) é uma doença óssea de origem metabólica, que se caracteriza por provocar lesões ósseas difusas, diminuindo a massa óssea mineralizada, alterando a estrutura normal do tecido ósseo tornando-o mais poroso e comprometendo a sua adequada função de suporte e resistência mecânica [80]. Numa fase mais evoluída, esta patologia leva à perda de resistência mecânica e consequente suscetibilidade para a ocorrência de fraturas [1].

1.2.1.1 Fisiopatologia

A osteoporose está invariavelmente associada à perda de massa óssea, e associada alterações no processo de remodelação, estando o aumento da reabsorção normalmente subjacente ao mecanismo de ação desta patologia. Por este facto, esta é uma das doenças que pode ser analisada no contexto das alterações na taxa de remodelação [81].

Cada BMU representa uma área de declínio de síntese óssea devido ao balanço negativo que se cria, ou seja, uma não correspondência entre volume de osso reabsorvido e formado. Para além do balanço negativo nas BMU's, o seu número está significativamente aumentado em indivíduos com osteoporose.

É concretamente ao nível dos osteoblastos e osteoclastos que são mais visíveis estas alterações, o que pode interferir em diversas fases da sua atividade, desde alterações nas suas células precursoras, como na sua atividade já em estado diferenciado. Ao nível das células osteoblásticas, verifica-se alterações que vão desde a redução do número de células mesenquimais indiferenciadas, redução da taxa de diferenciação de precursores osteoblásticos, até à diminuição da produção de osteóide por célula e redução do seu tempo de vida, o que se traduz na redução de formação óssea a nível tecidual, tornando-se insuficiente para compensar a perda óssea [14]. Por outro lado, também se verificam

alterações nas células osteoclásticas, como o aumento da sua taxa de diferenciação e da sua atividade, o que leva a uma reabsorção aumentada, pelo que se não existir uma resposta adequada por parte dos osteoblastos na sequência da reabsorção, gera-se um desequilíbrio na remodelação, que tem como consequência a perda de tecido mineralizado.

Todas estas alterações culminam na redução da densidade do tecido ósseo e alterações estruturais importantes.

O aumento da remodelação no processo fisiopatológico da osteoporose está relacionado com diversos fatores, destacando-se a diminuição dos níveis de cálcio decorrente do processo de envelhecimento, e a diminuição dos níveis de estrogénios associada à menopausa.

A absorção intestinal de cálcio está sob o controlo da forma ativa da vitamina D, 1,25-dihidroxitamina D [1,25(OH)₂D], (calcitriol), cuja produção diminui com a idade, devido à diminuição da atividade da 1 α -hidroxilase no rim, uma enzima que catalisa a sua produção. A diminuição da absorção de cálcio leva a uma diminuição da sua concentração plasmática. A PTH é uma hormona reguladora dos níveis plasmáticos de cálcio, cuja produção é estimulada quando os níveis plasmáticos de cálcio diminuem, ligando-se aos seus recetores nos osteoblastos, PTHR (*parathyroid hormone receptor*), promovendo a estimulação indireta da osteoclastogénese pelo aumento da expressão de RANKL e diminuição da expressão de OPG, com o consequente aumento da reabsorção óssea [82, 83].

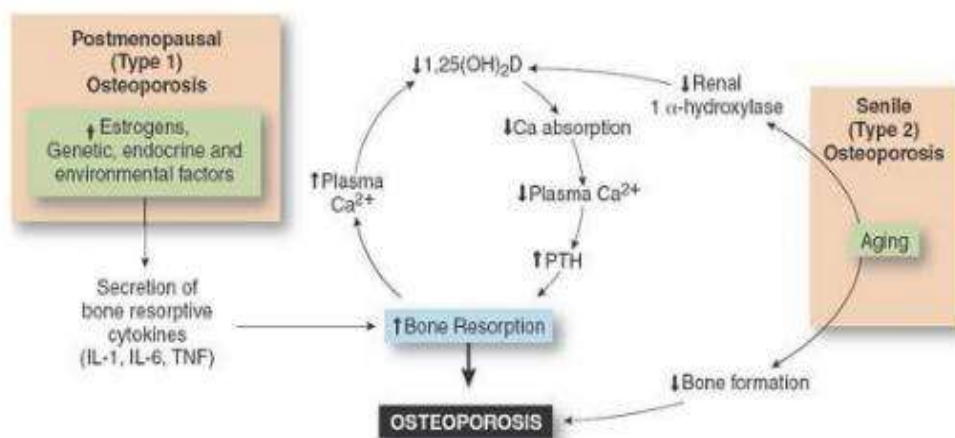


Figura 5: Ilustração esquemática da fisiopatologia da osteoporose [81]

Os estrogénios são hormonas chave na manutenção da massa óssea [9], estando identificados recetores para o estrogénio no tecido ósseo, ER α e ER β [84], ainda que numa menor escala, comparativamente com o tecido mamário ou o endométrio. Contudo, deficiências nos níveis de estrogénio têm consequências diretas na homeostasia e microarquitECTURA óssea.

Os estrogénios modulam a produção local de citocinas pró-inflamatórias envolvidas no processo de remodelação, como IL-1, IL-6, IL-7, TNF- α e M-CSF que atuam nas vias de sinalização da reabsorção óssea [85]

Níveis aumentados destas citocinas, têm vindo a ser associados à pós-menopausa, sendo a incidência de fraturas não traumáticas especificamente associada a altos níveis séricos de IL-6 [84, 86, 87].

Os estrogénios funcionam como um agente anti-reabsortivo, aumentando os níveis de OPG [88] [89], estando ainda envolvidos na apoptose osteoclástica, limitando também a sua formação pela inibição do recrutamento dos seus percursoros [90]. A deficiência em estrogénios leva a um aumento da produção de RANKL pelas células do estroma e células T, sinalizado pela produção destas citocinas pró-inflamatórias, o que interfere com o eixo de regulação RANKL/RANK/OPG.

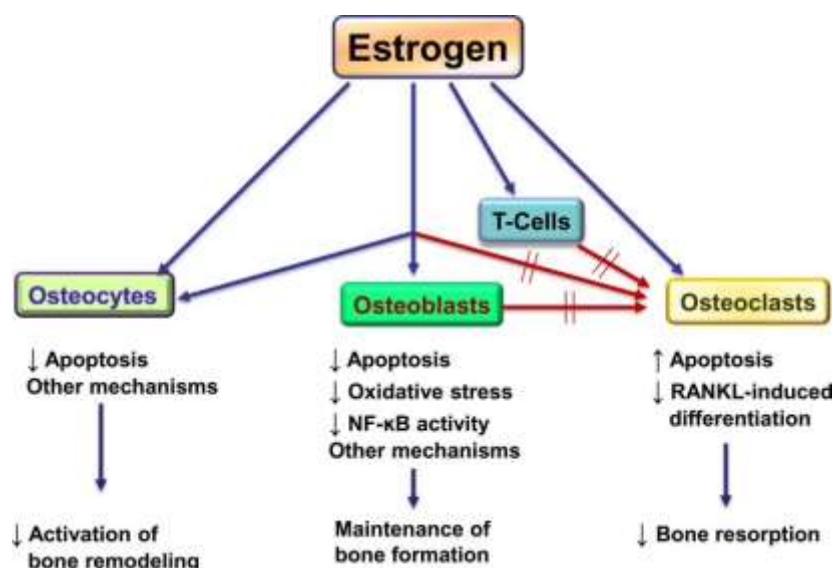


Figura 6: Mecanismo de ação dos estrogénios nas células ósseas [91].

Os estrogénios inibem a reabsorção exercendo a sua ação nas células ósseas. Estes atuam diretamente nos osteoclastos induzindo a sua apoptose e, indirectamente, diminuindo a expressão de RANKL. Esta hormona atua também nas células da linha osteoblástica, impedindo a sua apoptose, a indução de stress oxidativo e a activação da via NF- κ B.

1.2.2 Osteoartrite

A osteoartrite (OA) é uma doença articular degenerativa. É a forma de artrite mais frequente e uma das principais causas de incapacidade e perda de qualidade de vida nos países desenvolvidos. Afeta todos os tecidos da articulação: cartilagem, osso subcondral, membrana sinovial, ligamentos, músculos e, sobretudo as articulações que estão sujeitas a maior sobrecarga, como a articulação coxofemoral e a do joelho, podendo, no entanto, afetar qualquer articulação, incluindo as dos dedos. Os sintomas mais comuns são a dor que pode tornar-se severa, rigidez articular e perda de mobilidade [81].

O diagnóstico da OA baseia-se no achado de alterações radiográficas típicas em doentes com manifestações sintomáticas. Essas alterações radiográficas, que estão na base do diagnóstico, são a redução da espessura da cartilagem, a esclerose do osso subcondral e o aparecimento de osteófitos marginais. Quando estas alterações são patentes, o processo artrítico já está avançado, pelo que o diagnóstico por radiologia convencional nunca pode ser precoce.

Atualmente existem vários tratamentos e abordagens terapêuticas para a OA, que visam, na sua maioria, diminuir os sintomas. Existem formas de intervenção mais conservadoras, como mudanças no estilo de vida, terapia sintomática com injeções intra-articulares, AINE's (anti-inflamatórios não esteróides) ou fármacos com componentes da cartilagem como glucosamina e sulfato de condroitina, e mais invasivas como intervenções cirúrgicas. Os tratamentos num estado inicial da doença são maioritariamente dirigidos ao alívio dos sintomas, enquanto num estado de degradação e disfunção articular irreversível, as intervenções cirúrgicas são o método mais utilizado pelos clínicos [92] [93].

Estima-se que com o aumento da esperança média de vida e o crescente aumento de casos de obesidade, a prevalência desta doença se possa acentuar.

1.2.2.1 Fisiopatologia

Atualmente sabe-se que o processo fisiopatológico da OA está relacionado, não só com a degradação progressiva da cartilagem, mas também com as alterações estruturais e funcionais do osso subcondral, cujo papel no desencadeamento e progressão da doença é preponderante [94] [95]. Numa articulação saudável, os condrócitos mantêm um equilíbrio dinâmico entre a atividade catabólica e anabólica. Quando alterações biomecânicas e bioquímicas [96, 97] ocorrem no ambiente osteoarticular, esse equilíbrio

é interrompido, levando à sobreposição da atividade catabólica sobre a atividade anabólica, o que se traduz num aumento da expressão de enzimas que atuam na degradação da matriz cartilaginosa: agreganases, que degradam os proteoglicanos e MMP's, principalmente MMP-13, que degradam o colagénio [95].

Numa fase inicial da OA, há uma tentativa de resposta compensatória por parte dos condrócitos, que se tornam mais ativos produzindo maior quantidade de constituintes da matriz, tornando-se hipertróficos. Com a continuidade dos estímulos desencadeadores de stress na articulação, este mecanismo de compensação torna-se insuficiente e a cartilagem articular avança no seu processo de degradação [96].

A inflamação é um componente chave no início e progressão da OA. Diversos mediadores pró-inflamatórios produzidos pelos condrócitos da articulação artrósica, como IL-1, IL-6 e IL-17, TNF- α e PGE-2, desempenham um papel chave na indução da inflamação e na degradação da cartilagem articular. Estes fatores estimulam a produção de enzimas líticas que degradam a matriz, estimulando ainda a reabsorção óssea, atuando também nas vias de sinalização da dor associada à OA [98] [97]. A ligação da IL-1 β aos seus receptores estimula a transdução de sinal intracelular, levando à fosforilação das proteínas inibitórias IK β , permitindo a translocação do NF-kB para o núcleo. Adicionalmente, a IL-1 β é responsável pela activação das MAPK, ERK e p38, capazes de ativar o NF-kB, e ainda JNK, responsável pela activação do AP-1. A activação dos fatores de transcrição NF-kB e AP-1 leva à expressão de diversos genes pró-inflamatórios, induzindo a ação pró-inflamatória e catabólica nos condrócitos [99, 100].

O fator NF-kB desempenha um papel fisiológico importante em diversas células, contudo, a sua regulação inapropriada está implicada na génese de várias doenças, como a OA. Quando os condrócitos adquirem o fenótipo catabólico, a activação do NF-kB leva ao aumento da expressão de MMP's e agreganases. O NF-kB induz ainda a produção de óxido nítrico (NO), cicloxigenase 2 (COX-2), óxido nítrico sintase (NOS) e PGE2, que promove a síntese de fatores catabólicos, inflamação da cartilagem e apoptose dos condrócitos [101, 102].

Com o avançar da OA, a cartilagem articular é completamente destruída expondo o osso subcondral, que apresenta também alterações, encontrando-se mais denso e espesso e com a sua microarquitetura alterada, o que compromete as suas propriedades biomecânicas e de resposta à carga [103].

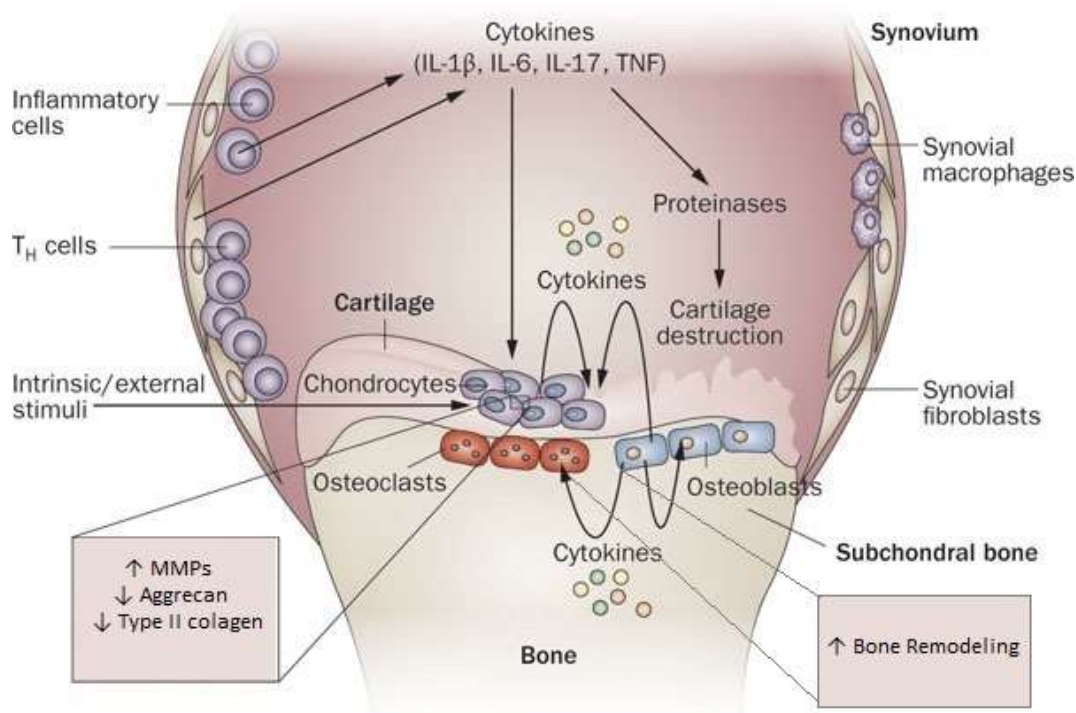


Figura 7: Mecanismo fisiopatológico da osteoartrite [104].

No processo fisiopatológico da OA, os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 ou TNF encontram-se aumentados, contribuindo para o agravamento da doença através da diminuição dos processos anabólicos na cartilagem e aumento das respostas catabólicas e inflamatórias, resultando em danos estruturais na articulação.

A sobrecarga e esclerose do osso subcondral, contribui para formação de microfraturas e danos, o que levará a que este tecido responda numa tentativa de reparação, formando nódulos osteocondrais, os osteófitos [97]. Estas alterações morfológicas e dinâmicas estão associadas ao aumento da taxa de remodelação do tecido ósseo subcondral, com alteração no metabolismo e atividade das células ósseas, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. [105] [106].

Na verdade, a ação fisiopatológica da OA relaciona os dois tecidos articulares, o osso e a cartilagem, criando-se uma rede de comunicação entre ambos os tecidos. Os fatores pró-inflamatórios produzidos pelos condrócitos, TNF- α , IL-1 β e IL-6 estimulam a produção de RANKL, induzindo desta forma o aumento da osteoclastogénese [107]. Os condrócitos são também capazes de produzir RANKL e OPG em determinados estados da doença [108], o que, dada a proximidade com o osso subcondral, poderá influenciar a sua taxa de remodelação. É possível que o RANKL produzido pelos condrócitos na camada mais profunda da cartilagem se difunda para o osso subcondral, ligando-se ao RANK dos osteoclastos ou seus precursores, ativando a osteoclastogénese e consequentemente a remodelação [109]. Verifica-se, assim, uma relação entre os eventos que ocorrem na

cartilagem e no osso subcondral, implicando uma comunicação por vias bioquímicas [110]. Adicionalmente, foi demonstrado que os níveis de OPG e RANKL se encontram anormalmente sintetizados, e o rácio OPG/RANKL significativamente reduzido [111].

1.3 Glucosamina e Sulfato de Condroitina

Muitos compostos têm sido investigados pelos seus potenciais efeitos no alívio dos sintomas da osteoartrite e nas alterações articulares associadas. Dois dos mais consumidos em todo o mundo são a glucosamina (GA) e o sulfato de condroitina (SC). Durante a última década, o consumo de glucosamina e sulfato de condroitina aumentou significativamente. Na maioria dos países da América do Norte, a GA e o SC são considerados suplementos alimentares (*nutraceuticals*), enquanto na maioria dos países europeus são comercializados como fármacos, obedecendo, desta forma, a normas de controlo e monitorização no que diz respeito a doses, formulações e pureza, o que não acontece com os suplementos alimentares [112].

Independentemente da sua classificação, estes compostos são utilizados no contexto de doenças articulares, sendo-lhes atribuídas propriedades de modificação do estado articular ou de alívio dos sintomas. No entanto, não existe um consenso entre a comunidade científica relativamente à sua eficácia, pelo que, apesar de diversos estudos lhes reconhecerem propriedades potencialmente benéficas, os resultados obtidos através de vários ensaios clínicos não permitem uma conclusão perentória em relação a esse assunto.

Os efeitos adversos descritos para o uso da GA e SC a longo prazo, são geralmente pouco comuns ou de baixo impacto [113], sendo os principais efeitos secundários relacionados com a sua administração a dor epigástrica, azia, diarreia ou náuseas [114], ou possíveis alterações no metabolismo da glucose e resistência à insulina [115, 116]. Os efeitos secundários ao nível do tecido ósseo são ainda mal conhecidos.

1.3.1 Glucosamina

A glucosamina é um aminomonossacarídeo hidrossolúvel, que está presente nos tecidos conjuntivos do corpo humano e em grande concentração na cartilagem, contribuindo para a resistência, elasticidade e flexibilidade destes tecidos [117]. É um componente de glicosamonoglicanos (GAG's), sendo utilizado na sua biossíntese [118].

A glucosamina pode ser encontrada sob diferentes formulações: sulfato de glucosamina, glucosamina hidríclorídrica, N-acetil-glucosamina ou em sais de cloridrato [117].

1.3.2 Sulfato de Condroitina

O sulfato de condroitina é um glicosaminoglicano sulfatado, e encontra-se normalmente ligado a proteínas, formando os proteoglicanos. É um importante componente estrutural da matriz extracelular de vários tecidos conjuntivos, incluindo a cartilagem articular [118]. Devido à sua grande representatividade neste tecido e ao facto de conferir resistência à compressão, este composto exerce um papel fundamental na sua integridade.

1.3.3 Farmacocinética e Biodisponibilidade

Existe evidência significativa que indica que ambos os compostos têm uma boa biodisponibilidade oral. No entanto existe alguma variabilidade no que diz respeito às dosagens recomendadas. As recomendações para a glucosamina sugerem uma dose de 500mg, três vezes ao dia, enquanto outros prescrevem uma dose única de 1500mg diária [119].

É importante referir que as propriedades físico-químicas e mecânicas destes compostos, podem variar segundo as fontes obtidas, o que levará a diferentes perfis de biodisponibilidade.

1.3.4 Ação biológica da glucosamina e sulfato de condroitina

Devido ao papel essencial dos agrecanos na integridade da cartilagem, compostos que favoreçam a sua síntese, poderiam ser benéficos no contexto de doenças que se caracterizem pelo desgaste articular, legitimando a suplementação oral com estes compostos. Esta é uma das hipóteses teóricas para a sua aplicação.

O processo fisiopatológico da OA assenta no desequilíbrio entre o estado catabólico e anabólico da cartilagem articular. Neste sentido, fármacos que possam alterar a progressão da doença, melhorando o estado da cartilagem, atuam no sentido de estimular a regeneração, amplificando os efeitos anabólicos e diminuindo a atividade catabólica.

São vários os efeitos descritos no que diz respeito ao atraso da progressão da doença e melhoria da condição articular por parte da GA e do SC. Estudos *in vitro* sugerem que a GA e SC podem atuar especificamente através de três mecanismos de ação:

Efeito anabólico:

- aumentar os níveis de glicosaminoglicanos [120, 121].
- regular positivamente os níveis de mRNA de genes ligados à formação de agrecanos, tendo este efeito uma relação dose-dependente [120] [122].
- aumentar a expressão génica de agrecanos e colagénio tipo II com concentrações de 100 microM, mas inibindo-os com concentrações de 10-20mM [121]. No entanto outros estudos indicam que a glucosamina (na forma hidrocloreídrica ou sulfato) regula negativamente a produção de colagénio tipo II e agrecanos para concentrações de 5 mM [123]
- Aumentar a proliferação de condrócitos [124]
- Aumentar a síntese de colagénio, da atividade da fosfatase alcalina e da secreção de osteocalcina [125].

Efeito anti-catabólico

- bloquear parcialmente os efeitos da IL-1, que regula negativamente a expressão de colagénio tipo II e dos agrecanos [121].
- diminuição da concentração de metaloproteinases da matriz: MMP-3 [120] [126] [127] e MMP-13 [121] e dos níveis de atividade enzimática.

- Regulação positiva da produção de fatores de crescimento como TGF- β [124]
- Aumento do rácio OPG/RANKL no osso subcondral [128]
- Diminuição da reabsorção no osso subcondral [128]
- Inibição da expressão de mRNA da NO (*nitric oxide*) sintase induzível e NO [129, 130].
- Efeito antioxidante [131]

Efeito anti-inflamatório:

- Inibição da translocação nuclear do NF-kB [132]
- Inibição da ativação do NF-kB em condrócitos de humanos com OA [133]
- Inibição da síntese de PGE2 [125, 133, 134]
- Efeito anti-inflamatório na produção de TNF- α e IL-1 β [125]
- Inibição da degradação de agreganos [135, 136]
- Atividade anti-apoptótica [132, 137, 138]

1.3.5 Aplicabilidade clínica da glucosamina e sulfato de condroitina

Apesar da grande popularidade adquirida pela glucosamina e sulfato de condroitina, e do seu consumo estar vastamente difundido em todo o mundo, estes não reúnem consenso entre a comunidade científica quanto à sua eficácia e aplicação clínica.

Ao longo das últimas décadas, diversos estudos foram realizados para avaliar a eficácia da GA e SC. Se por um lado uns defendem a sua eficácia no alívio da dor, ação protectora da estrutura articular e atraso na progressão da doença [139-141], outros estudos, na maioria ensaios clínicos, põem em causa a sua eficácia, indicando não existirem efeitos clínicos significativos, comparativamente com placebo, na diminuição da dor, modificação da estrutura articular, inflamação e função [142-144].

1.3.6 Glucosamina, Sulfato de Condroitina e Células Ósseas

No sentido de compreender os efeitos da GA e SC particularmente na osteoclastogênese, que é parte fundamental do metabolismo ósseo, torna-se necessário reunir, analisar e entender os efeitos conhecidos, até à data, destes compostos neste tecido, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*.

Atualmente existe uma grande quantidade de estudos realizados, que descrevem a ação da GA e SC na progressão da OA, mais concretamente em relação aos seus efeitos na cartilagem articular. Contudo, estudos que abordem a ação destes compostos em tecido ósseo, e em particular nas suas células, são escassos, permanecendo ainda muitas questões em aberto neste âmbito. São ainda mal conhecidos os efeitos concretos da GA e SC no metabolismo ósseo ao nível de diversos parâmetros celulares como proliferação, diferenciação e integridade, atividade e, sobretudo, mecanismos intracelulares envolvidos. No entanto, alguns estudos existentes, *in vitro* e *in vivo*, apresentam alguns resultados importantes que visam esclarecer vários aspectos relativos à ação destes dois fármacos no metabolismo ósseo, oferecendo uma perspetiva de como estes parecem atuar no contexto do metabolismo ósseo, servindo como base teórica para a elaboração de outros estudos.

Os estudos abaixo enumerados, apresentam um conjunto de conclusões que parecem apontar num sentido mais ou menos convergente no que diz respeito à ação da GA e SC no tecido ósseo.

▪ **Estudos *in vitro*:**

Tabela 1 - Resumo dos trabalhos realizados <i>in vitro</i> com GA e/ou SC em células ósseas.			
Autores	Fármaco	Tipo de células	Resultado
Kwan Tat et al. (2007) [128]	GA e SC	Osteoblastos Osteoclastos	Aumento do rácio OPG/RANKL
Tatsuya Miyazaki et al. (2009) [145]	CS	Osteoclastos	Inibição da diferenciação osteoclástica em células RAW-264
Mamoru Igarashi et al. (2011) [93]	GA	Osteoclastos	Indução da diferenciação osteoblástica; Supressão da expressão de RANKL
Chien-Hsun Huang et al. (2010) [146]	GA	Osteoblastos	Indução da diferenciação osteoblástica de células pluripotentes da polpa dentária
Moon Moo Kim et al. (2007) [125]	GA	Osteoblastos	Indução da diferenciação osteoblástica de células MG-63
Juliane Salbach-Hirsch et al. (2014) [147]	SC	Osteoblastos Osteoclastos	Indução da diferenciação osteoblástica; Inibição do suporte osteoblástico da osteoclastogénese.

Os dados recolhidos sugerem que estes fármacos parecem melhorar a função osteoblástica, e inibir a osteoclástica, não apenas de forma direta, mas também através da regulação da produção de fatores que favorecem a osteoclastogénese e que são produzidos pelos osteoblastos. Esta tendência que parece ser mais ou menos clara, sendo suportada pelas conclusões que estes estudos nos apontam.

Segundo Kwan Tat e colaboradores, a presença de GA e SC parece não comprometer a integridade celular dos osteoblastos, não afetando a produção de marcadores fenotípicos como ALP e OCN [128], referindo ainda que estes fármacos em combinação são capazes de modular a expressão de OPG e RANKL, levando a um aumento do rácio OPG/RANKL, devido à regulação positiva da produção de OPG e inibição da produção de RANKL. Adicionalmente, foi demonstrado que o sulfato de glucosamina (SG) aumentou os níveis de ALP, síntese de colagénio, OCN e mineralização em células osteoblásticas MG-63, através de um mecanismo anti-inflamatório [125].

Ainda no contexto da diferenciação osteoblástica, a GA parece revelar um efeito favorecedor no aumento da expressão de marcadores de diferenciação osteoblástica no que respeita a marcadores das fases intermédia, OPN e final, OCN [93]. Resultados no mesmo sentido foram observados num estudo que utilizou células pluripotentes de polpa dentária, revelando que a baixas concentrações (0.005 mg/mL) se verificava um efeito osteogénico promovendo a diferenciação destas células no sentido osteoblástico, através de mecanismos intracelulares que utilizam o TGF- β 1 como regulador positivo do Runx-2, fundamental na diferenciação osteoblástica, regulando também positivamente a ALP [146].

Relativamente à ação destes fármacos na função osteoclástica direta e indirecta (suporte paracrino), os resultados seguem a mesma lógica; a expressão de RANKL foi significativamente diminuída na presença de derivados de GA, promovendo não só a diferenciação osteoblástica, como também suprimindo a formação e activação osteoclástica [93]. No que diz respeito a efeitos diretos na diferenciação osteoclástica, num estudo que utiliza uma linha celular de macrófagos, RAW-264, os resultados mostraram que o SC inibe a diferenciação osteoclástica e impede a formação de locais de reabsorção em placas de fosfato de cálcio [145]. Apenas o SC mostrou inibir a diferenciação osteoclástica de forma direta, não existindo na literatura estudos que apoiem a mesma conclusão relativamente à GA.

▪ Estudos *in vivo*

Tabela 2 - Resumo dos trabalhos in vivo com GA e/ou SC em células ósseas			
Autores	Fármaco	Tipo de células	Resultado
Martin Wildi et al. Lukas (2011) [148]	SC	Osteoblastos Osteoclastos	Diminuição das lesões medulares de osso subcondral após 12 meses
Wolfgang Schneider et al. (2007) [149]	SC	Osteoblastos Osteoclastos	Indução da remodelação óssea e formação de novo tecido em áreas adjacentes a implantes colocados em modelos animais (ovelhas)
Akın UĞRAŞ et al. (2013) [150]	SG	Osteoblastos Osteoclastos	Estimulação da regeneração de fraturas da tíbia em modelos animais, (ratinhos), visível apenas histologicamente
Roberto Guarniero et al. (2007) [151]	GA e SC	Osteoblastos Osteoclastos	Sem resultados favoráveis ou desfavoráveis na consolidação de fraturas induzidas experimentalmente

No que diz respeito aos efeitos *in vivo* já estudados, a tendência parece ser semelhante, verificando-se um efeito favorecedor da osteogênese. As principais conclusões destes estudos referem diminuição de lesões medulares do osso subcondral, verificadas num estudo duplamente cego realizado em doentes com OA [148]. Num outro estudo que utilizou modelos animais em grande escala, os resultados corroboram no mesmo sentido: a adição de SC em implantes ósseos à base de colagénio e hidroxiapatite pareceu induzir o aumento da formação de tecido ósseo nas imediações dos implantes, tendo um possível efeito na adesão de citocinas e fatores de crescimento à matriz extracelular ou à superfície óssea, induzindo a remodelação no sentido da formação de novo tecido ósseo [149]. Adicionalmente, parece ainda verificar-se um aumento da diferenciação osteoblástica e da formação de material ósseo no contexto da regeneração de fraturas em modelos animais (ratinhos) [150].

De uma maneira geral, estes estudos parecem apontar para resultados mais ou menos convergentes, no que diz respeito à sua ação favorecedora da osteogênese. Estes fármacos parecem, incrementar a função osteoblástica, e modular através de fatores paracrínicos a função osteoclástica, inibindo a expressão de fatores produzidos pelos osteoblastos, como o RANKL, que estimulam a osteoclastogênese.

2 Materiais e Métodos

2.1 Culturas Celulares

2.1.1 Isolamento de células mononucleadas de sangue periférico

As PBMC foram isoladas a partir de sangue periférico humano de doadores saudáveis do sexo masculino, de idades compreendidas entre os 25 e os 35 anos.

Diluiu-se o sangue em PBS (*phosphate buffer solution*) + EDTA 2mM na proporção de 1:2 e transferiu-se para tubos contendo Ficoll-Paque™ PREMIUM (GE Healthcare Bioscience). Depois de centrifugar a 400g durante 30min, as PBMC foram recolhidas e lavadas duas vezes com PBS+EDTA 2mM, procedendo-se a uma centrifugação a 300g, 4°C, durante 10 minutos entre cada lavagem. As PBMC foram semeadas a uma densidade de $1,5 \times 10^6$ células/cm².

2.1.2 Cultura de PBMC com Glucosamina e Sulfato de Condroitina

As culturas celulares foram mantidas em α -MEM contendo 30% (V/V) soro humano (proveniente do mesmo dador de onde foram recolhidas as PBMC), 100IU/ml penicilina, 2,5µg/ml anfotericina β e 2mM L-1 glutamina, a 37°C, numa atmosfera húmida contendo 5% CO₂. As culturas foram tratadas com glucosamina e sulfato de condroitina às concentrações de 20, 100 e 500µg/mL separadamente e em todas as combinações possíveis destas concentrações.

As culturas celulares foram avaliadas através de actividade e coloração histoquímica da TRAP.

De forma a caracterizar os mecanismos intracelulares envolvidos, as culturas tratadas com 100µg/mL glucosamina + 100µg/mL sulfato de condroitina, foram suplementadas com inibidores de vias de sinalização osteoclastogénicas, nomeadamente 1µM U0126 (inibidor da via MEK/ERK 1/2), 10 µM PD98,059 (inibidor da via MEK/ERK 1), 10 µM PDTC (inibidor da via NF- κ B), 5µM GO6983 (inibidor da via PKC), 10 µM SP600125 (inibidor da via JNK), 5 µM SB202190 (inibidor da via p38) e 1µM indometacina (inibidor das prostaglandinas).

As culturas celulares foram avaliadas através de atividade e coloração histoquímica da TRAP.

2.2 Caraterização das Culturas Celulares

2.2.1 Quantificação da proteína total

A concentração proteica celular foi determinada pelo método de Bradford. Após duas lavagens das células com PBS, procedeu-se à solubilização das mesmas, com NaOH 0,1M. As amostras foram diluídas com água destilada e tratadas com reagente de Bradford (Fluka). Após homogeneização, quantificou-se a absorvância a 595nm. Os resultados foram expressos em mg/mL.

2.2.2 Quantificação da actividade da TRAP

A atividade da TRAP foi quantificada através do método colorimétrico de hidrólise de pNPP (*para*-nitrofenol fosfato). As culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS e solubilizadas com Triton X-100 0,1% (V/V) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação adicionou-se uma solução de pNPP a 10mM preparado em 0,04 M tartarato, 0,09M nitrato, a pH 4.8. Seguiu-se um a incubação de 1 hora, a 37°C, após a qual se adicionou NaOH a 5M de forma a parar a reação. Foi determinada a absorvância a 400nm. A atividade da TRAP foi normalizada pela proteína celular total para cada condição, e os resultados foram expressos em nmol/min/mg.

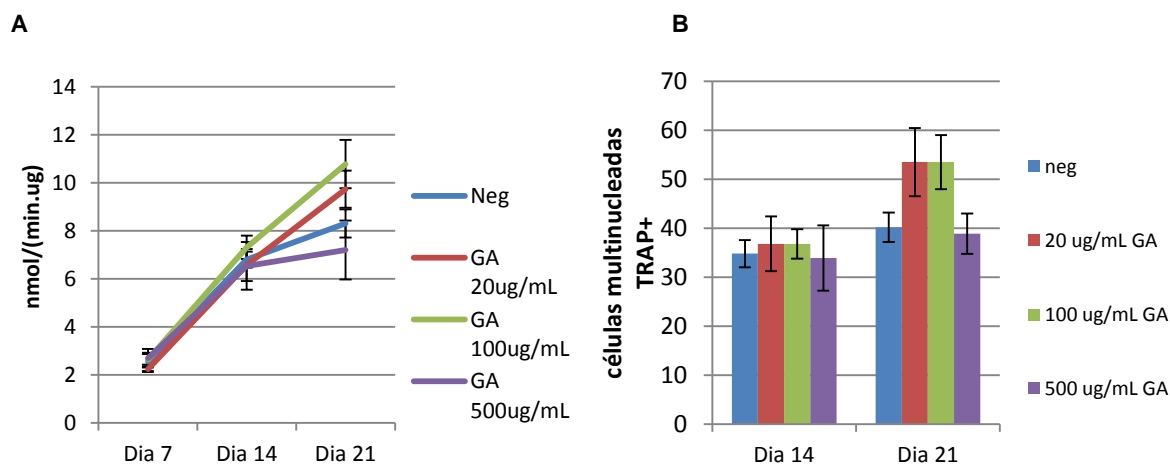
2.2.3 Coloração histoquímica da TRAP

As culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS, seguindo-se uma fixação com 3,7% (v/v) formaldeído durante 30 segundos e posterior lavagem com água destilada por duas vezes. As células foram coradas com o *Acid Phosphatase Leutoryte (TRAP) Kit* (SIGMA), de acordo com as indicações do fabricante. Resumidamente, as amostras foram incubadas durante 1 hora, a 37°C, na presença de 0,12 mg/ml naftol AS-BI, 6,76 nM tartarato e 0,14 mg/ml Fast Garnet GBC. Após incubação, as amostras foram lavadas com água e coradas com hematoxilina durante 2 minutos. Procedeu-se a uma nova lavagem com água e, posteriormente, à visualização das camadas celulares em microscopia ótica. As células multinucleadas e positivas para a TRAP (MNC TRAP+) foram contadas.

3 Resultados

3.1 Avaliação do Potencial Osteoclastogénico de GA e SC em culturas de PBMC's.

Numa primeira fase do trabalho, pretendeu-se avaliar o potencial osteoclastogénico da Glucosamina e do Sulfato de Condroitina em culturas de PBMC's. Para tal, as culturas foram tratadas com estes fármacos em diferentes concentrações, isoladamente e em combinação um com o outro, sendo que foram testadas todas as combinações possíveis destes compostos, para a gama de concentrações analisada. Paralelamente, utilizou-se como controlo negativo culturas de PBMC's mantidas na ausência de qualquer suplementação. Todas as combinações foram testadas em dois meios distintos: em meio base (BM) onde se pretendeu avaliar a osteoclastogénese espontânea (não induzida), e em meio contendo os fatores osteoclastogénicos M-CSF e RANKL (M+R), sendo avaliada a osteoclastogénese induzida.



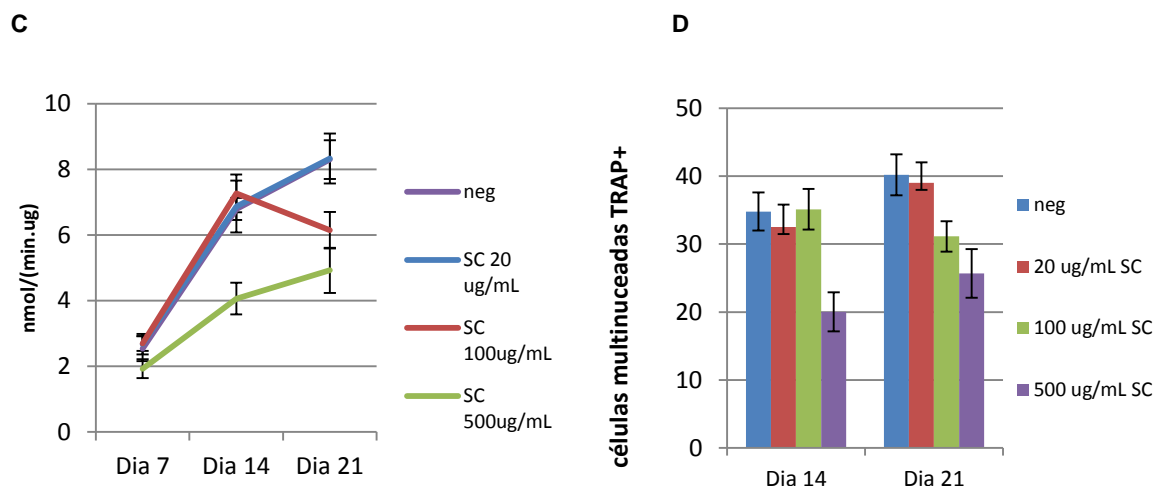


Figura 8: Atividade (A e C) e coloração histoquímica da TRAP (B e D) em culturas de PBMC tratadas com GA e SC isoladamente em diferentes concentrações (20, 50 e 100 ug/mL) e em meio base (BM). Atividade da TRAP avaliada aos dias 7, 14 e 21. Coloração histoquímica da TRAP observada aos dias 14 e 21.

Aos 7, 14 e 21 dias, as culturas celulares foram caracterizadas para a atividade da TRAP (Fig. 8A e 8C) e aos 14 e 21 dias para a coloração histoquímica da TRAP (Fig. 8B e 8D).

Na ausência de suplementação com fatores osteoclastogênicos, verificou-se que, ao dia 21, as culturas celulares suplementadas com GA (Fig. 8A), apresentaram valores para a atividade da TRAP significativamente superiores ao controle, particularmente nas concentrações de 20 e 100ug/mL. Relativamente às culturas suplementadas com SC (Fig. 8C), verifica-se uma diminuição desta atividade relativamente ao controle para as concentrações de 100 e 500 ug/mL.

De uma maneira geral, os resultados obtidos para a contagem de MNC (*multinucleated cells*) TRAP+ (Fig. 8B e 8D) estão em concordância com os resultados obtidos para a atividade da TRAP.

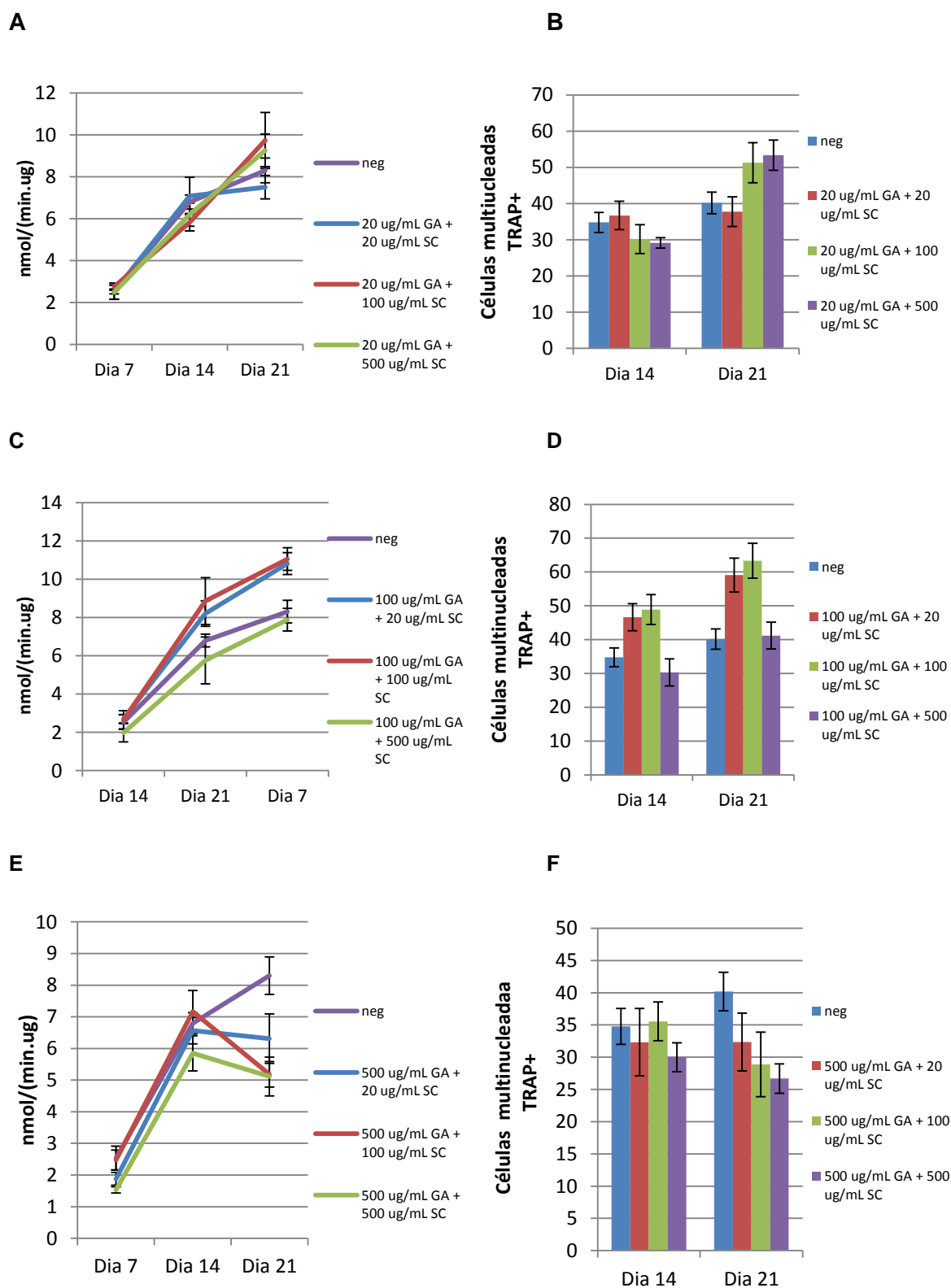


Figura 9: Atividade (A, C e E) e coloração histoquímica da TRAP (B, D e F) em culturas de PBMC tratadas com todas as combinações de GA (20, 100 e 500ug/mL) e de SC (20, 100 e 500 ug/mL), em meio base (BM). Atividade da TRAP avaliada aos dias 7, 14 e 21. Coloração histoquímica da TRAP observada aos dias 14 e 21.

Em meio base, as culturas suplementadas com todas combinações de 20ug/mL de GA e SC (Fig. 9A) apresentam valores de atividade da TRAP idênticos ao controlo negativo. As culturas suplementadas com as combinações de 100ug/mL de GA e SC (Fig. 9C) apresentam um aumento ligeiro da atividade de TRAP nas combinações de 100ug/mL de GA com 20 e 100 ug/mL de SC. Relativamente às combinações de 500ug/mL de GA e SC (Fig. 9E), verifica-se uma diminuição ligeira da atividade da TRAP para todas as combinações de concentrações.

De uma maneira geral, os resultados obtidos para a contagem de MNC TRAP+ (Fig. 9B, 9D e 9F) estão em concordância com os resultados obtidos para a atividade da TRAP.

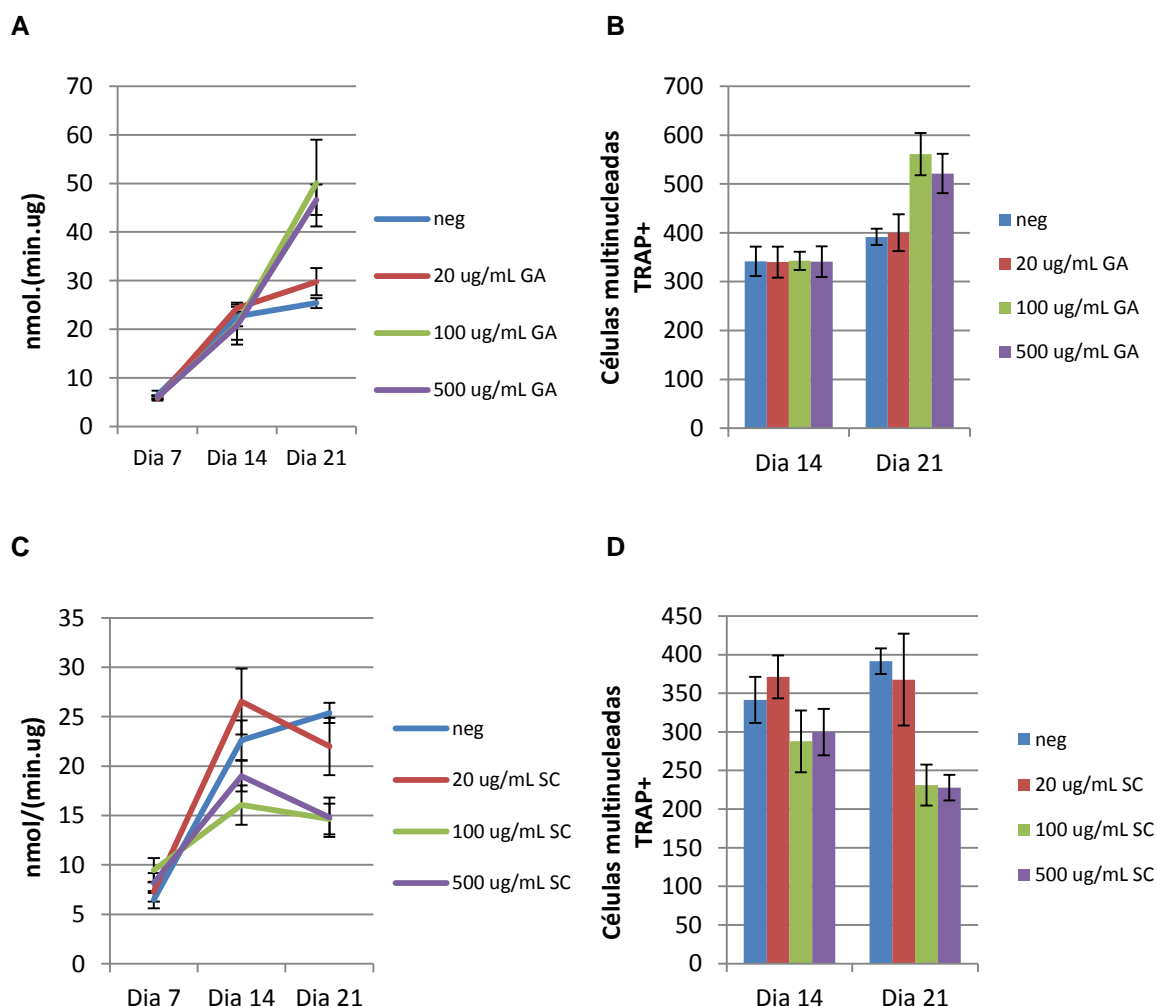
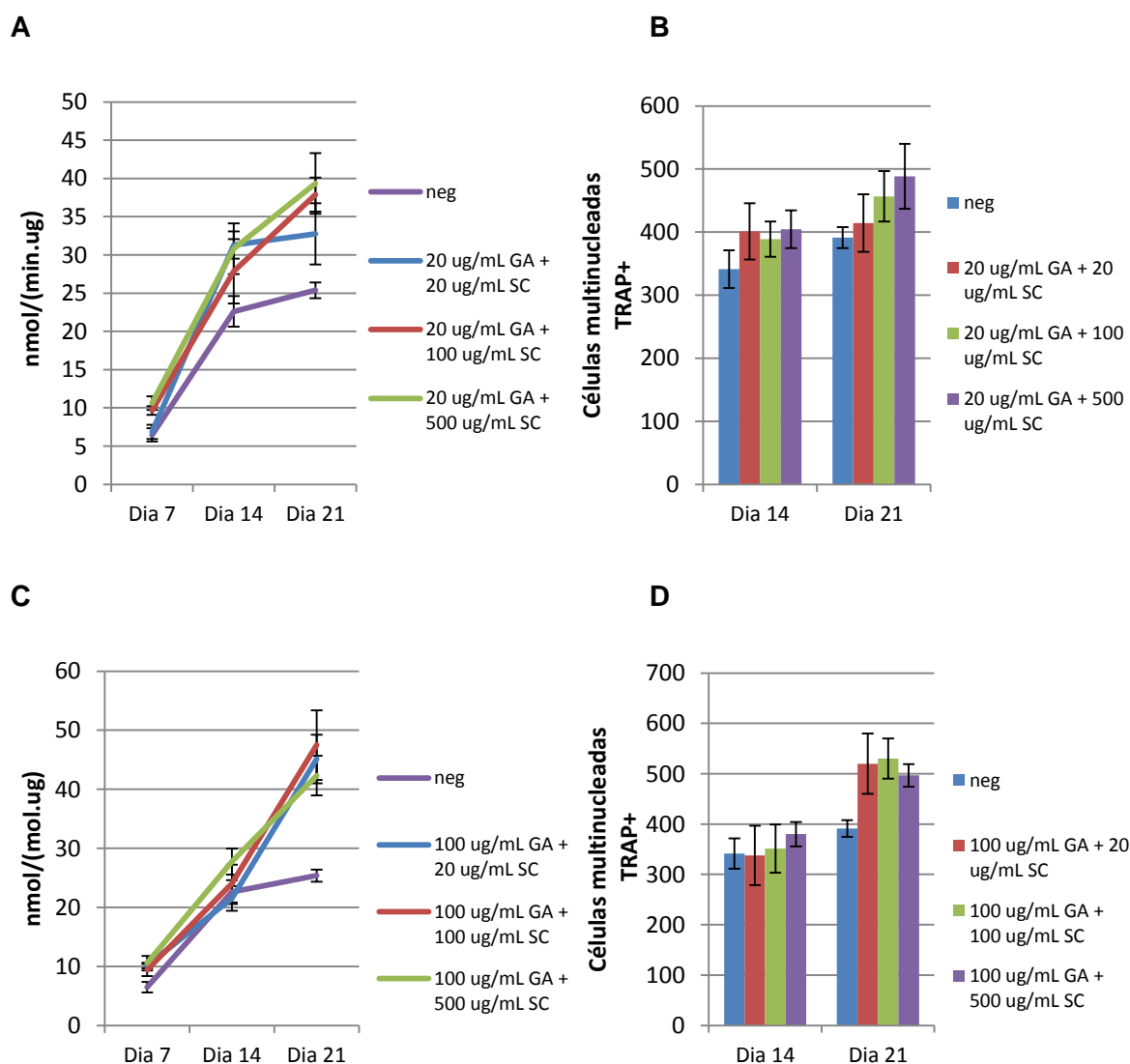


Figura 10: Atividade (A e C) e coloração histoquímica da TRAP (B e D) em culturas de PBMC tratadas com GA e SC isoladamente em diferentes concentrações (20, 50 e 100 ug/mL), em meio suplementado com fatores osteoclastogénicos (M+R). Atividade da TRAP avaliada aos dias 7, 14 e 21. Coloração histoquímica da TRAP observada aos dias 14 e 21.

Na presença de fatores osteoclastogênicos (M+R) as culturas celulares suplementadas com GA (Fig.10A) apresentaram valores para a atividade da TRAP significativamente superiores (entre três a cinco vezes superiores) em relação aos resultados em meio base (BM) (Fig. 8A), e superiores em relação ao controlo negativo, particularmente nas concentrações de 100 e 500 ug/mL, em que se verifica um aumento desta atividade em cerca do dobro. Nas culturas suplementadas com CS (Fig. 10C) verifica-se também um aumento da atividade da TRAP (entre duas a três vezes) reativamente às mesmas condições em meio base (BM) (Fig. 8C) e uma diminuição para cerca de metade da atividade da TRAP, relativamente ao controlo, que se revela mais significativa para as condições referentes às concentrações de 100 e 500 ug/mL.

De uma maneira geral, os resultados obtidos para a contagem de MNC TRAP+ (Fig. 10B e 10D) estão em concordância com os resultados obtidos para a atividade da TRAP.



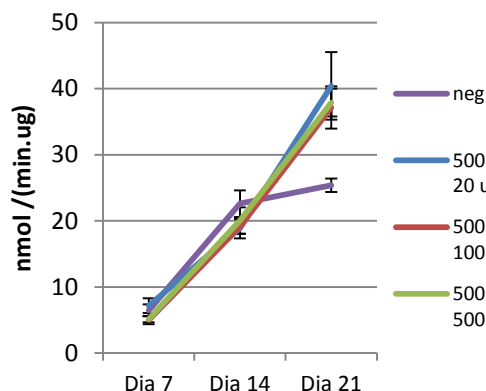
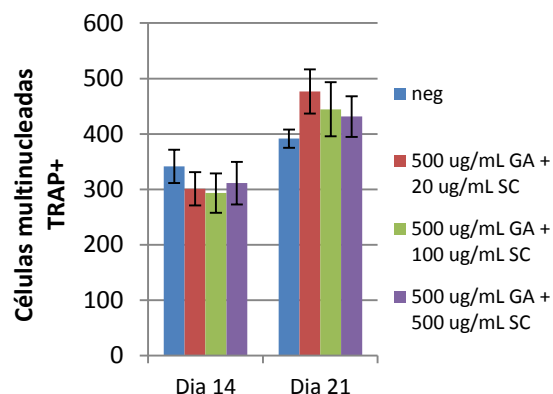
E**F**

Figura 11: Atividade (A, C e E) e coloração histoquímica da TRAP (B, D e F) em culturas de PBMC tratadas com todas as combinações possíveis de GA (20, 100 e 500ug/mL) e de SC (20, 100 e 500 ug/mL), em meio contendo fatores osteoclastogênicos (M+R). Atividade da TRAP avaliada aos dias 7, 14 e 21. Coloração histoquímica da TRAP observada aos dias 14 e 21.

Na presença de fatores osteoclastogênicos (M+R) as culturas celulares suplementadas com todas as combinações possíveis de GA e SC (Fig. 10A, 10C e 10E) apresentaram valores para a atividade da TRAP significativamente superiores (entre três a cinco vezes) em relação aos resultados em meio base (BM).

Globalmente, verificou-se um aumento da atividade da TRAP em relação ao controle negativo, visível em todas as combinações GA e CS em meio com fatores osteoclastogênicos (M+R). A condição que aponta para valores mais elevados é a que corresponde à combinação de 100 ug/mLGA +100ug/mL CS, que apresenta um aumento em cerca do dobro, em relação ao controle.

Os resultados obtidos para a contagem de MNC TRAP+ (Fig. 11B, 11D e 11F) estão em concordância com os resultados obtidos para a atividade da TRAP.

3.2 Caracterização dos efeitos intracelulares na osteoclastogénese induzida pela presença de glucosamina e sulfato de condroitina, em culturas de PBMC.

Após a determinação da concentração mínima de cada um dos fármacos, capaz de causar um efeito significativo na osteoclastogénese, procedeu-se a uma análise dos efeitos intracelulares dos mesmos. Para tal, as PBMC foram cultivadas na presença de inibidores de vias de sinalização importantes no desenvolvimento osteoclástico, nomeadamente U0126, PDTC, GO6983, SP600125, SB202190, PD98,059 e indometacina, sendo determinada a percentagem de inibição induzida por cada um deles. Utilizou-se como controlo culturas de PBMC sem qualquer suplementação de GA ou SC, em meio base (BM) e em meio com fatores osteoclastogénicos (M+R). As culturas celulares foram caracterizadas para a atividade da TRAP após 7, 14 e 21 dias, e para a sua coloração histoquímica após 14 e 21 dias.

	PBMC (BM)		100 GA (BM)		100 SC (BM)		100 GA + 100 SC (BM)	
	Dia 14	Dia 21	Dia 14	Dia 21	Dia 14	Dia 21	Dia 14	Dia 21
U0126 1uM	63,14 ± 6,94	66,17 ± 7,88	68,65 ± 5,58	25,01 ± 3,17	24,62 ± 3,00	13,81 ± 1,56	10,16 ± 1,45	91,79 ± 7,12
PDTC 10 uM	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00	99,06 ± 0,94	97,58 ± 2,42	98,91 ± 1,10	98,83 ± 1,17	98,17 ± 1,83	98,37 ± 1,63
GO6983 5 uM	36,93 ± 4,00	48,49 ± 6,15	91,21 ± 8,06	92,00 ± 8,00	92,66 ± 7,34	87,08 ± 9,10	38,78 ± 4,20	21,94 ± 2,65
SP600125 10 uM	43,80 ± 5,12	56,93 ± 6,67	95,77 ± 8,06	91,04 ± 8,96	89,63 ± 8,34	93,55 ± 6,61	78,63 ± 9,50	80,09 ± 9,00
SB202190 5 uM	6,54 ± 0,77	11,54 ± 1,23	0,00 ± 0,00	22,73 ± 3,19	5,60 ± 0,65	0,00 ± 0,00	10,07 ± 1,86	17,95 ± 2,10
PD98,059 10 uM	42,13 ± 3,34	64,16 ± 5,57	98,41 ± 2,60	96,44 ± 3,56	95,72 ± 4,28	96,31 ± 3,69	97,36 ± 2,74	80,46 ± 4,58
Indometacina 1 uM	0,01 ± 0,00	1,36 ± 1,16	11,53 ± 1,57	0,00 ± 0,00	9,81 ± 1,00	0,00 ± 0,00	4,82 ± 0,56	0,00 ± 0,00

Tabela 3: Percentagem de inibição e desvio padrão aos dias 14 e 21, em culturas de PBMC suplementadas com inibidores de várias vias osteoclastogénicas, em meio base (BM).

Verifica-se que o inibidor U126 1uM promove uma percentagem de inibição significativa na condição 100GA + 100 SC ao dia 21, relativamente ao controlo, enquanto nas restantes condições, para o mesmo inibidor, a percentagem de inibição é significativamente menor. Adicionalmente, os inibidores SP600125 10uM e PD98, 059 induzem percentagens de inibição significativamente superiores ao controlo, (cerca de duas vezes superior) nas condições 100 GA (BM), 100SC (BM) e 100 GA + 100 SC (BM) assim como o inibidor GO6983 5uM nas condições 100GA (BM) e 100 SC (BM).

	PBMC (M+R)		100 GA (M+R)		100 SC (M+R)		100 GA + 100 SC (M+R)	
	Dia 14	Dia 21	Dia 14	Dia 21	Dia 14	Dia21	Dia 14	Dia 21
U0126 1uM	44,80 ± 5,52	49,81 ± 5,56	64,32 ± 4,59	29,70 ± 3,34	85,04 ± 8,85	82,88 ± 12,11	75,78 ± 8,13	81,89 ± 9,10
PDTC 10 uM	100,00 ± 0,0	100,00 ± 0,0	98,85 ± 1,15	97,17 ± 2,83	99,06 ± 0,94	99,56 ± 0,44	98,80 ± 1,20	99,91 ± 0,09
GO6983 5 uM	48,12 ± 5,01	33,65 ± 4,45	91,51 ± 8,51	90,32 ± 8,18	88,52 ± 10,01	84,69 ± 9,27	99,28 ± 0,72	98,08 ± 1,92
SP600125 10 uM	54,06 ± 4,11	44,98 ± 5,02	90,29 ± 9,23	88,50 ± 6,67	97,01 ± 2,99	97,74 ± 2,26	72,98 ± 8,55	59,48 ± 6,67
SB202190 5 uM	79,02 ± 9,49	94,42 ± 0,58	0,20 ± 0,02	0,00 ± 0,00	20,00 ± 2,34	2,99 ± 0,42	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
PD98,059 10 uM	3,32 ± 0,78	6,56 ± 0,75	98,97 ± 1,03	90,65 ± 7,12	95,77 ± 4,23	97,11 ± 2,89	92,06 ± 7,94	91,06 ± 7,14
Indometacina 1 uM	7,45 ± 0,93	8,89 ± 1,00	7,91 ± 0,65	0,26 ± 0,03	1,65 ± 0,23	0,00 ± 0,00	46,61 ± 5,56	24,88 ± 3,12

Tabela 4: Percentagem de inibição e desvio padrão aos dias 14 e 21, em culturas de PBMC em meio com fatores osteoclastogénicos (M+R), suplementadas com inibidores de várias vias osteoclastogénicas.

Verifica-se que os inibidores GO6983 5uM e PD98,059 causaram uma inibição significativamente superior ao controlo, para todas as condições. De forma semelhante, o inibidor SP-600125 10 uM promove percentagens de inibição significativamente superiores ao controlo (cerca do dobro), para as condições 100 GA e 100 SC. A indometacina causa uma elevada percentagem de inibição relativamente ao controlo para a condição 100 GA + 100 SC. Por outro lado, a inibição verificada na presença de SB202190 no controlo, foi significativamente superior à observada nas restantes condições experimentais.

O perfil de envolvimento das vias de sinalização na osteoclastogénese modulada pela GA e SC, relativamente ao controlo, encontra-se resumido na tabela 5.

<u>Via de sinalização</u>	100 GA		100 SC		100 GA + 100 SC	
	BM	M + R	BM	M + R	BM	M + R
NF-kB	-	-	-	-	-	-
MEK1	↑	↑	↑	↑	↑	↑
MEK1/2	-	-	-	↑	-	↑
JNK	↑	↑	↑	↑	↑	-
P38	-	↓	-	↓	-	↓
PKC	↑	↑	↑	↑	-	-
PGE2	-	-	-	-	↑	↑

Tabela 5: Perfil de envolvimento das vias de sinalização testadas na osteoclastogénese modulada pela GA e SC sozinhos e em combinação, em meio base (BM) e na presença de fatores osteoclastogénicos (M+R), em relação ao controlo.

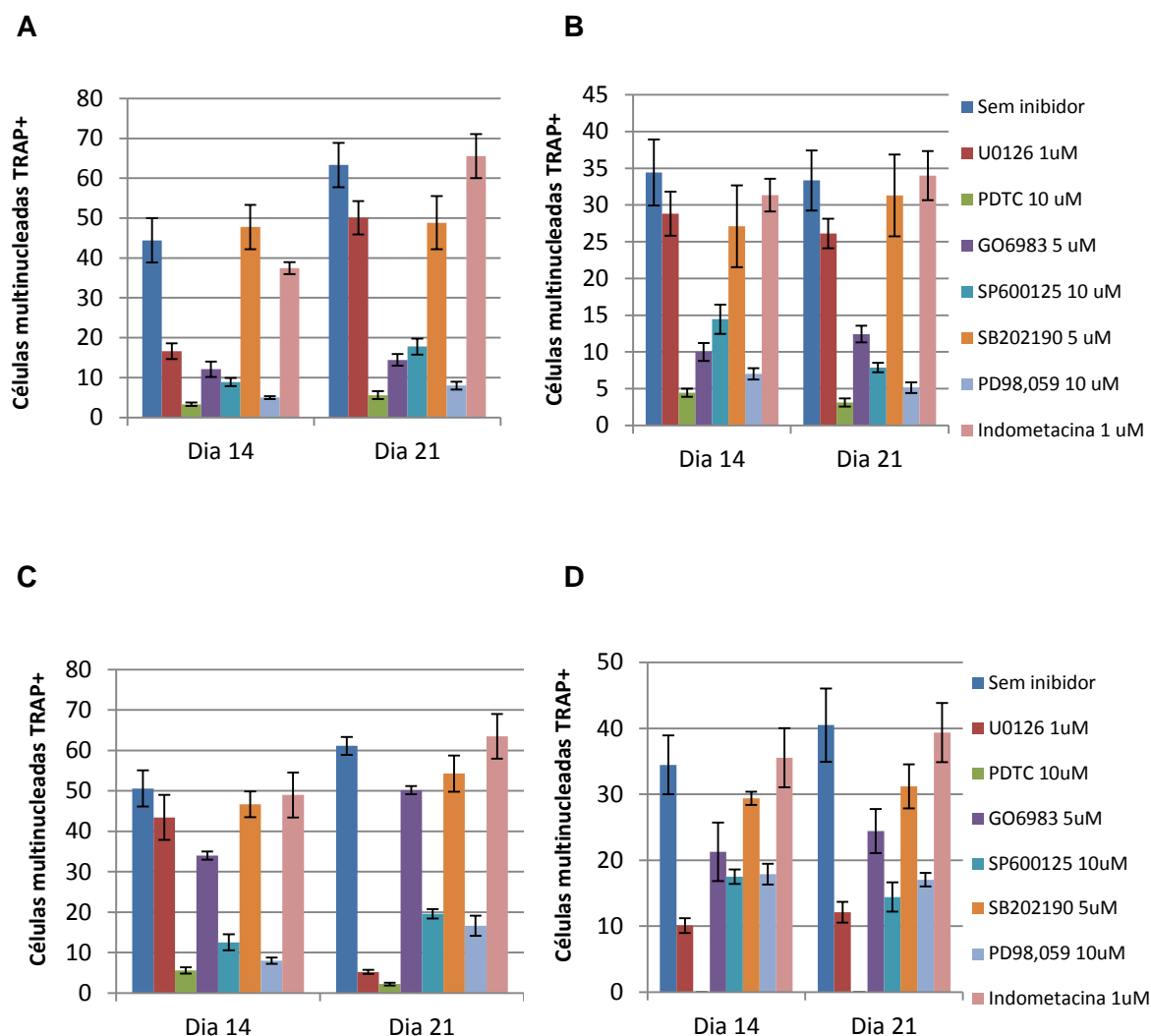


Figura 12: Coloração histoquímica da TRAP aos dias 14 e 21 , em culturas de PBMC em diferentes condições (A: 100ug/mL GA ; B:100ug/mL SC ; C: 100ug/mL GA + 100ug/mL SC ; D: PBMC) suplementadas com inibidores de vias de sinalização da osteoclastogênese, em meio base (BM).

De uma maneira geral, a contagem de MNC TRAP+ foi concordante com os valores obtidos para a atividade da TRAP.

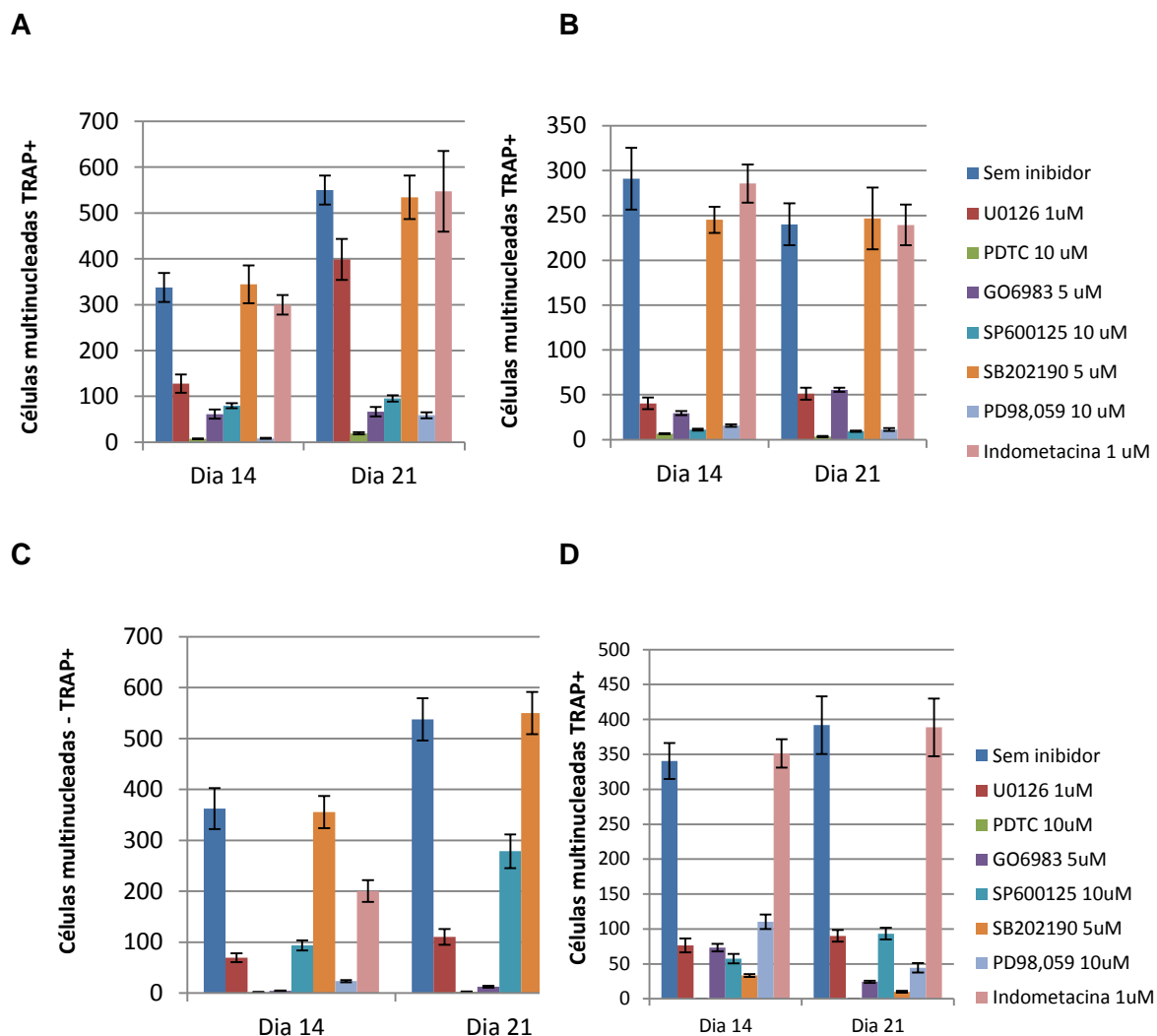


Figura 13: Coloração histoquímica da TRAP aos dias 14 e 21 , em culturas de PBMC em diferentes condições (A: 100ug/mL GA ; B:100ug/mL SC ; C: 100ug/mL GA + 100ug/mL SC ; D: PBMC) suplementadas com inibidores de vias de sinalização da osteoclastogênese, em meio contendo fatores osteoclastogênicos (M+R).

De uma maneira geral, a contagem de MNC TRAP+ foi concordante com os valores obtidos para a atividade da TRAP.

4 Discussão

A GA e o SC são dois fármacos amplamente utilizados no contexto da prevenção e tratamento de doenças osteoarticulares, sendo-lhes reconhecidas propriedades anti-catabólicas e anti-inflamatórias na cartilagem, tecido para o qual é dirigida a sua ação. Uma vez que os tecidos, ósseo e cartilagíneo, partilham uma proximidade anatómica, têm constituição orgânica semelhante e apresentam processos fisiológicos interdependentes, é importante perceber se estes fármacos têm um efeito ao nível do osso. Contudo, apesar de estes compostos serem considerados seguros, e serem muito utilizados para o tratamento de doentes com OA, o conhecimento existente relativo ao seu efeito no tecido ósseo é escasso. O tecido ósseo é um tecido dinâmico que está em constante remodelação de forma a manter a sua integridade e função, que se caracteriza pelo equilíbrio dinâmico entre reabsorção osteoclástica e síntese osteoblástica. O aumento da osteoclastogénese e consequente destruição do tecido ósseo envolvido é um denominador comum a doenças que afetam o osso, como a osteoartrite ou a osteoporose.

Neste contexto, este trabalho pretendeu avaliar o efeito da GA e SC na osteoclastogénese humana e caracterizar os mecanismos intracelulares envolvidos.

A avaliação da osteoclastogénese modulada pela GA e SC serve de ponto de partida para averiguar os efeitos destes fármacos no metabolismo ósseo, de forma a elucidar os efeitos secundários que possam estar associados à sua administração.

A gama de concentrações utilizada neste trabalho, abrange as concentrações plasmáticas máximas obtidas após o tratamento regular [152, 153], não existindo, até ao momento, dados disponíveis sobre as concentrações no osso. Existe uma margem por excesso relativamente à concentração máxima testada, de forma a apurar um possível efeito tóxico associado.

Numa fase inicial deste trabalho, os precursores osteoclásticos (PBMC's) foram cultivados na presença de GA e SC, na ausência de qualquer estímulo osteoclastogénico exógeno, de forma a determinar o potencial de modulação da osteoclastogénese em precursores não estimulados (osteoclastogénese espontânea).

Os resultados mostraram que a GA parece estimular a osteoclastogénese espontânea em PBMC's, sendo este efeito mais notório para as condições de 20 e 100ug/mL. No caso do SC, a tendência parece ser oposta, verificando-se uma inibição da

osteoclastogénese na presença deste fármaco, que se fez notar nas condições de 100 e 500 ug/mL.

Paralelamente, as mesmas concentrações foram testadas em culturas de PBMC's mantidas na presença dos indutores osteoclastogénicos M-CSF e RANKL (M+R), como estímulo para direcionar as PBMC's para osteoclastogénese. Nestas condições, a GA estimulou a osteoclastogénese, mais concretamente nas condições 100 e 500ug/mL, parecendo haver uma maior dependência do aumento da concentração. No caso do SC, verificou-se uma diminuição da osteoclastogénese para cerca de metade, relativamente ao controlo, nas condições 100 e 500 ug/mL.

Assim, a GA parece ter um efeito estimulador da osteoclastogénese, enquanto o SC apresenta um efeito inibitório que se torna mais evidente na presença de estímulos osteoclastogénicos exógenos (suplementação com M-CSF e RANKL). O SC é um glicosaminoglicano (GAG) que existe naturalmente na matriz óssea e cartilaginosa. Os GAG fazem parte da estrutura dos proteoglicanos (PG), que consistem numa estrutura dicotómica com um *core* proteico ao qual se ligam GAG's. Compostos como heparina (HP), sulfato de heparina (SH), sulfato de dermatana (SD) ou SC, pertencem à família dos GAG's, diferindo no padrão da cadeia polisacarídica e no padrão de sulfatação. Estas têm, reconhecidamente, propriedades em vários processos biológicos, incluindo a organização da matriz extracelular, a modulação da adesão e migração celular, controlo de proliferação e diferenciação, assim como a ligação a diversos fatores proteicos [154-156]. Diversos fatores, entre os quais, fatores envolvidos na regulação da osteoclastogénese, possuem domínios de ligação para a heparina, aos quais outros GAG's se podem ligar, e assim exercer a sua ação biológica no metabolismo ósseo.

O efeito *in vitro* dos GAG's na osteoclastogénese é ainda controverso. Alguns estudos revelam que as GAG's exercem um efeito inibidor na diferenciação osteoclástica, enquanto outros apontam para um efeito estimulador [12]. Segundo Juliane Salbach-Hirsch e colaboradores, o SC estimula a diferenciação osteoblástica e inibe o suporte paracrínico da osteoclastogénese [147]. Adicionalmente, este parece modular a expressão de OPG e RANKL em células osteoblásticas, aumentando a expressão de OPG e diminuindo a expressão de RANKL, aumentando assim o rácio OPG/RANKL.

Vários estudos referem que o principal mecanismo envolvido na ação inibitória do SC na osteoclastogénese é a sua ligação à molécula de RANKL e diminuição da sua biodisponibilidade, impedindo a ligação ao seu recetor RANK [157, 158].

A OPG possui também um domínio de ligação para a heparina, permitindo-lhe a interação com GAG's [159]. Segundo alguns autores, alguns glicosaminoglicanos

sulfatados têm a capacidade de prolongar o tempo de semi-vida do RANKL, ligando-se à molécula de OPG, bloqueando assim a sua atividade [160, 161]. A OPG é um a proteína que funciona como um antagonista da diferenciação osteoclástica, ligando-se à molécula de RANKL, impedindo assim que esta se ligue ao seu recetor RANK. Segundo estes dados, os GAG's podem modular a remodelação óssea, induzindo a diminuição dos níveis de OPG biodisponíveis e assim, indiretamente, aumentando os níveis de RANKL ao nível membranar e, conseqüentemente, a osteoclastogénese [160].

Num estudo mais recente, que utilizou três diferentes modelos de osteoclastogénese e vários tipos de GAG's, para testar o seu efeito neste processo, demonstrou que todos os GAG's testados inibiam a osteoclastogénese em todos os sistemas testados. Apesar de vários estudos terem demonstrado a capacidade de ligação das GAG's ao RANKL, o mesmo estudo revelou que a heparina não se ligou ao RANKL, e sugere como mecanismo de ação subjacente ao efeito dos GAG's na osteoclastogénese a inibição da adesão e fusão dos precursores osteoclásticos, não havendo interferência na sinalização via RANKL [162].

O modelo utilizado neste trabalho foi caracterizado na ausência de células osteoblásticas, o que permitiu investigar o efeito direto do SC na diferenciação osteoclástica. O efeito supressor do SC da osteoclastogénese evidenciado neste trabalho pode ser discutido sob vários pontos de vista, parecendo ser plausível associar este efeito à sua ação no sistema RANKL-RANK, podendo especular-se que o SC se possa ligar ao domínio de ligação do RANKL e, desta forma, bloquear a sua ligação ao seu recetor RANK, impedindo a ativação de toda a sinalização celular que culmina na expressão de genes característicos dos osteoclastos. Alternativamente, os resultados obtidos poderão ser explicados pela ação do SC através mecanismos independentes do RANKL, como por exemplo, através do M-CSF, que atua não na diferenciação dos osteoclastos, mas numa fase mais precoce, favorecendo a fusão dos precursores mononucleados. Assim, será necessário desenvolver estudos adicionais que caracterizem, de forma mais específica, a interação das GAG's com este e outros fatores osteoclastogénicos, de forma a perceber o mecanismo exato subjacente à ação inibitória do SC na osteoclastogénese.

Os GAG's e os proteoglicanos exercem um conjunto de atividades no contexto do metabolismo ósseo que se assume muito complexo, pelo que num contexto biológico poderá ser difícil determinar o seu papel, dada a multiplicidade de interações possíveis entre o SC e os diferentes intervenientes da osteoclastogénese. No entanto, perante os

dados obtidos neste trabalho, o efeito direto do SC na diferenciação osteoclástica parece ser inibitório.

O efeito da GA na osteoclastogénese, verificado neste trabalho, apresenta alguma disparidade relativamente ao efeito associado ao SC. Os resultados revelam que a GA parece exercer um efeito estimulador da osteoclastogénese, comparativamente com o controlo. Os valores apresentados para a atividade da TRAP são cerca de quatro vezes superiores na presença de fatores osteoclastogénicos, comparativamente com os valores em condições basais, tendo sido potenciado pelo aumento da concentração.

A GA é um amino-monossacarídeo precursor da unidade de dissacarídeos que forma os GAG's, sendo considerada uma unidade fundamental para a formação dos GAG's. O mecanismo de ação da GA na cartilagem está atualmente bem documentado, envolvendo principalmente a inibição de fatores catabólicos como as MMP e o estímulo da síntese de GAG's [120, 121]. Contudo, o conhecimento atual acerca do efeito da GA no metabolismo ósseo, nomeadamente na osteoclastogénese, é muito escasso. Relativamente a este processo, existem, até à data, apenas alguns dados sobre os seus efeitos na regulação paracrínica dos osteoclastos, não existindo estudos acerca da influência direta da GA em células osteoclásticas. Num estudo realizado com osteoblastos obtidos de doentes com OA, a GA demonstrou não alterar a integridade celular dos osteoblastos[128]. Apesar de no estudo referido não se ter avaliado o efeito deste fármaco diretamente em células osteoclásticas, mas antes dos seus efeitos na modulação paracrínica da atividade osteoclástica, este estudo revelou ainda que, que a GA pode modular a atividade osteoclástica de forma indireta, através dos osteoblastos. Contudo, existem alguns aspetos que se devem considerar, pois os osteoblastos utilizados neste estudo provêm de doadores com OA, não traduzindo exatamente o que acontece no microambiente do tecido ósseo normal. Neste contexto, os níveis de RANKL podem surgir elevados à partida, uma vez que em doentes com OA as citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α ou PGE2, encontram-se aumentadas e estimulam a sua expressão.

Verificou-se previamente que a GA aumenta a expressão de marcadores das fases intermédia e final da diferenciação osteoblástica e suprime a expressão de RANKL [93]. Por outro lado, outra formulação de glucosamina, o sulfato de glucosamina (SG), mostrou aumentar a atividade da ALP (uma enzima abundantemente produzida pelos osteoblastos), a síntese de colagénio e a produção de osteocalcina em células MG-63, revelando uma ação estimuladora da diferenciação e atividade osteoblásticas através de mecanismos anti-inflamatórios, inibindo a produção de TNF- α , PGE-2 e IL-1 β [125].

Também em estudos *in vivo* a GA parece ter um efeito osteogénico, favorecendo a regeneração de fraturas induzidas em modelos animais, através de mecanismos que envolvem a estimulação osteoblástica, sugerindo que a GA possa ter propriedades regenerativas [150]. Estes efeitos potencialmente anabólicos no tecido ósseo estão, em certa medida, concordantes com os resultados obtidos no presente trabalho.

A maioria dos estudos *in vitro* que aborda a ação da GA no osso, utiliza células osteoblásticas, pelo que a sua ação no metabolismo ósseo é sobretudo conhecida do ponto de vista osteoblástico, sendo o efeito da GA na osteoclastogénese direta e os mecanismos envolvidos, ainda desconhecidos. Contudo, algumas hipóteses poderão considerar-se, nomeadamente a modulação negativa da produção de moléculas osteoclastogénicas, tais como mediadores pró-inflamatórios.

A discrepância observada nos efeitos promovidos pelo SC e pela GA, poderá ser explicada à luz das diferenças estruturais e moleculares que existem entre estes dois compostos, e das suas diferentes afinidades com diversos ligandos, particularmente o RANKL. Como a GA é um monossacarídeo, a sua afinidade ao domínio de ligação para a heparina existente no RANKL poderá ser mais fraca, comprometendo o seu papel inibitório nesta molécula, e consequentemente afectando positivamente a osteoclastogénese. No entanto, convém realçar que o efeito estimulador da osteoclastogénese foi observado quer em culturas efectuadas na ausência, quer na presença de M-CSF e RANKL, o que sugere que o potencial efeito da GA através da interacção com o RANKL não será, porventura, o único mecanismo associado. Também o grau de sulfatação das GAG's é considerado um fator importante na regulação da osteoclastogénese, tendo sido sugerido num estudo recente que a inibição desta é potenciada pelo grau de sulfatação das GAG's [163]. O SC é um GAG sulfatado, pelo que o maior efeito inibidor do SC na osteoclastogénese verificado neste trabalho, comparativamente com a GA, poderá estar relacionado com este facto. Outras possibilidades são também consideradas: a GA poderá atuar na osteoclastogénese através da modulação da produção e/ou atividade de outros fatores que possam intervir no processo, sem ter que se ligar diretamente a esta molécula, ou pode ainda atuar através de mecanismos independentes do RANKL como a produção de TNF- α . Os mecanismos exatos através dos quais a GA favorece a osteoclastogénese permanecem como um tema com grande potencial para ser explorado. Mais estudos serão necessários para avaliar os mecanismos específicos que regulam a osteoclastogénese induzida pela GA.

As PBMC's foram ainda testadas na presença de GA e SC de forma combinada, tendo sido estudadas todas as combinações possíveis da gama de concentrações utilizada neste trabalho. Todas as combinações foram testadas em meio base (BM) e na presença de fatores osteoclastogénicos (M+R).

Os resultados demonstram que em condições basais, todas as combinações de GA e SC promovem valores de atividade da TRAP semelhantes ao controlo, exceto as condições compostas por 500GA com todas as concentrações de SC, em que esta atividade apresenta uma ligeira inibição. Na presença de fatores osteoclastogénicos, os valores de atividade da TRAP foram três a cinco vezes superiores em relação aos valores em condições basais, revelando um aumento da osteoclastogénese em relação ao controlo em todas as combinações possíveis de GA e SC, sendo associado um maior potencial osteoclastogénico à condição 100GA+100SC. Apesar do perfil de estimulação osteoclástica da GA e SC ser diferente isoladamente, a análise dos seus efeitos em combinação deverá ter em conta os seus efeitos de forma separada, bem como potenciais interações químicas e/ou funcionais entre ambas as moléculas. Uma das hipóteses para este efeito verificado será a predominância do efeito estimulador da GA na osteoclastogénese quando os compostos estão presentes na forma combinada. Outro possível mecanismo poderá ser a modulação do efeito do SC nos osteoclastos pela ação da GA através de mecanismos desconhecidos, que resulta num efeito sinérgico, estimulando ambos a osteoclastogénese. A presença de fatores indutores da osteoclastogénese no meio parece ser um requisito para que este efeito se verifique. Isto sugere que a GA combinada com SC poderá atuar numa fase intermédia ou tardia da osteoclastogénese, necessitando de um comprometimento prévio dos precursores osteoclásticos para que se desencadeiem os passos iniciais. A ausência de consenso e os resultados controversos publicados relativamente à ação da GA e SC na osteoclastogénese, pode dever-se à utilização de diferentes abordagens experimentais, como diferentes espécies em modelos *in vivo*, proveniência das células, condições de cultura, ou diferentes estados fisiológicos e/ou patológicos das células.

A condição com maior potencial osteoclastogénico foi utilizada para avaliar os efeitos intracelulares induzidos pela GA e SC, de forma a esclarecer quais as vias osteoclastogénicas mais solicitadas na sua presença. Foram testadas várias vias de sinalização que se sabe estarem envolvidas na osteoclastogénese: a via NF- κ B, PKC, JNK, p38, e MEK/ERK 1/2 e prostaglandinas. Para tal, as PBMC foram cultivadas na presença de inibidores dessas mesmas vias de sinalização, sendo determinada a percentagem de inibição da osteoclastogénese induzida por cada um deles.

A sinalização envolvida na osteoclastogênese humana envolve uma complexa rede de cascatas de sinalização que culminam na expressão de genes típicos dos osteoclastos, que permitem a sua diferenciação. A caracterização das vias envolvidas na presença de GA e SC oferece uma perspectiva ao nível intracelular, da forma como estes dois fármacos poderão modular a osteoclastogênese. Atualmente, a informação que existe na literatura sobre as vias intracelulares envolvidas na osteoclastogênese induzida pela GA ou pelo SC é muito escassa.

Os resultados obtidos neste trabalho revelam que existem três vias de sinalização que estão mais fortemente envolvidas na osteoclastogênese induzida pela GA e SC. Estas vias são a PKC, a JNK e a MEK/ERK, uma vez que os inibidores específicos destas vias induziram percentagens de inibição significativamente superiores ao controlo, quantificadas através da inibição da atividade da TRAP, uma enzima produzida em abundância pelos osteoclastos [164]. Por outro lado, a via p38 parece ser um mecanismo menos utilizado na osteoclastogênese condicionada por estes fármacos. Existem, contudo, algumas condicionantes que caracterizam o envolvimento de cada uma destas vias em particular.

Uma das vias mais importantes na osteoclastogênese é a via NF- κ B. A translocação do NF- κ B para o núcleo no processo de diferenciação osteoclástica é um evento fundamental, tendo sido comprovado em diversos estudos que, perante a sua inibição, não se formam osteoclastos. A solicitação desta via na osteoclastogênese mediada pela GA e SC não diferiu do controlo, onde se verificou uma inibição total, como seria de esperar, dado o papel crucial que a NF- κ B tem na osteoclastogênese. Assim, esta via não parece ser afetada pela presença de GA ou SC.

Tanto a GA como o SC parecem estimular a osteoclastogênese através do envolvimento da via PKC. Contudo, a sua ação conjunta apenas utiliza esta via na presença de um comprometimento osteoclástico.

As MEK são cinases responsáveis pela fosforilação das ERK e a sua ativação. Uma vez que na presença de inibidores desta via, a osteoclastogênese parece não ser inibida em alguns contextos experimentais [165], mas antes estimulada [166], pensa-se que a via ERK esteja envolvida numa regulação complexa da osteoclastogênese desempenhando funções relacionadas com a sobrevivência dos osteoclastos e não com a sua diferenciação. Os inibidores utilizados para testar estas vias foram o U0126 que inibe tanto a via MEK1 como a MEK2, e o PD98059 que inibe mais especificamente a MEK1. Os resultados mostram que a via MEK1 é amplamente solicitada na

osteoclastogénese induzida pela GA e o SC em todas as condições testadas, não necessitando de estímulo osteoclástico para essa função. Estes dados revelam que esta será uma via importante no processo, podendo estar envolvida numa fase mais primordial da osteoclastogénese. A via MEK2 apenas foi estimulada na presença de SC, indicando que esta via estará especificamente envolvida na osteoclastogénese induzida pelo SC. A via ERK1 parece ter mais relevância na osteoclastogénese modulada por estes fármacos, tanto separados como em combinação. O diferente perfil de inibição da MEK1 e MEK2 poderá eventualmente advir de algumas diferenças quanto à ação dos dois inibidores da MEK relacionadas com as diferenças moleculares inerentes a cada um deles [167], ou estar associado a uma menor capacidade inibitória por parte do U0126.

Neste trabalho, verificou-se ainda que na modulação do processo osteoclastogénico quer pela GA como pelo SC, a via p38 é um mecanismo que é suprimido, sugerindo que esta via não tem um papel importante nestas condições. Na osteoclastogénese, a via p38 e a via ERK parecem funcionar num equilíbrio recíproco em que a inibição da fosforilação da via p38 resulta no aumento dos níveis de ERK fosforilada, e na presença de inibidores da via ERK os níveis de fosforilação da p38 aumentam [166]. Poderá supor-se que, a não utilização da via p38 possa influir na solicitação da via ERK, não existindo, contudo, dados neste trabalho que comprovem essa relação.

O envolvimento da via JNK na osteoclastogénese induzida pela GA e SC verifica-se em todas as condições, exceto quando a GA e SC estão presentes na forma combinada e na presença de estimulação osteoclástica. Esta é uma via que parece ser importante para a osteoclastogénese induzida pela GA e SC, sem necessidade de estímulo osteoclástico, pelo que a JNK poderá ser uma via necessária sobretudo numa fase inicial ou intermédia da osteoclastogénese modulada por estes fármacos.

A osteoclastogénese induzida por estes fármacos poderá implicar algum envolvimento da produção de prostaglandinas inflamatórias, nomeadamente PGE2, quando estes se encontram em combinação e na presença de fatores osteoclásticos.

Apesar da aplicabilidade da GA e SC levantar algumas questões controversas, os efeitos biológicos destes fármacos são suportados por diversos estudos *in vitro*, que lhes reconhecem propriedades anabólicas, anti-catabólicas e anti-inflamatórias, sobretudo ao nível da cartilagem articular, justificando o efeito condroprotetor associado a estes fármacos. Sabe-se atualmente que, não só a cartilagem articular, como também o osso subcondral, desempenha um papel importante no processo fisiopatológico da OA, existindo um crescente número de estudos que tem vindo a dar força a essa hipótese [94,

95]. Adicionalmente, o tecido cartilágneo e o tecido ósseo, são tecidos histológica e anatomicamente relacionados, existindo alguma interdependência nos processos bioquímicos que neles decorrem. Desta forma, apesar da ação da GA e do SC ser mais especificamente dirigida à cartilagem, de forma a modular a atividade dos condrócitos, os seus efeitos no tecido ósseo não devem ser negligenciados. Os resultados deste trabalho revelaram que a GA e o SC exercem efeitos na diferenciação osteoclástica, cuja atividade representa uma parte fundamental do metabolismo ósseo. Diversos processos fisiopatológicos do do osso têm por base o aumento da atividade osteoclástica e consequentemente da remodelação, pelo que a influência destes fármacos na diferenciação osteoclástica e a caracterização das vias envolvidas, se assume como um assunto relevante. Apesar de esta ser uma abordagem experimental *in vitro*, estes resultados devem sempre ser levados em consideração.

5 Conclusão

A glucosamina e o sulfato de condroitina têm a capacidade de afetar a osteoclastogénese, tanto de forma separada como de forma conjunta. O sulfato de condroitina mostrou regular negativamente a osteoclastogénese, enquanto a glucosamina teve um efeito estimulador. Em combinação, estes fármacos têm uma ação potenciadora da osteoclastogénese. O efeito exercido por estes fármacos na osteoclastogénese, envolve algumas alterações em diferentes vias de sinalização caracterizadas. As vias de sinalização envolvidas neste processo, parecem ser, de uma forma geral, afectadas da mesma forma pelos dois fármacos.

Este estudo contribuiu para uma melhor compreensão do papel da glucosamina e do sulfato de condroitina numa parte do metabolismo ósseo, de forma a apurar possíveis efeitos secundários neste tecido, relacionados com a administração destes fármacos. Em conclusão, o sulfato de condroitina parece demonstrar um potencial efeito anabólico, enquanto que a glucosamina poderá ter um efeito potencialmente catabólico. O seu efeito em combinação parece demonstrar um potencial perfil catabólico. Este efeito pode influenciar o normal funcionamento do metabolismo ósseo e, consequentemente provocar um efeito prejudicial neste tecido. Contudo, não é possível estabelecer uma correlação direta entre estes resultados e o contexto clínico/fisiológico, pois o ambiente *in vivo* é extensamente mais complexo, para além de que este trabalho aborda apenas uma parte do metabolismo ósseo. Neste sentido, novos estudos com novas abordagens deverão ser desenvolvidos para melhor apurar os mecanismos exatos subjacentes à ação destes fármacos, demonstrada neste trabalho, de forma a melhor contextualizar a sua administração, abrindo perspectivas para novas abordagens terapêuticas.

6 Perspetivas Futuras

Este trabalho serve de ponto de partida para a compreensão da ação da GA e do SC no osso, sendo a osteoclastogénese apenas uma parte do metabolismo deste tecido. No contexto da osteoclastogénese, novas moléculas deverão ser introduzidas em futuras abordagens experimentais, por exemplo, OPG, para tentar apurar se os resultados se manteriam ou teriam a mesma expressão, ou TNF- α , para avaliar possíveis mecanismos independentes do RANKL. Deverão ser abordados também aspectos específicos relacionados com a atividade dos osteoclastos, como adesão e reabsorção. De forma a complementar estes resultados, e obter uma perspectiva mais alargada da sua ação no metabolismo ósseo, parece pertinente avaliar o efeito destes fármacos igualmente na diferenciação e função osteoblástica. Uma vez que a atividade dos osteoclastos e dos osteoblastos é altamente interdependente, avaliar a ação destes fármacos em co-culturas destas células seria também necessário. Os mecanismos envolvidos na atividade e diferenciação das células ósseas modulada por estes fármacos, deverão ser mais especificamente descritos, realizando estudos que esclareçam a forma como estes fármacos interagem com os fatores envolvidos no metabolismo ósseo. As vias intracelulares deverão ser caracterizadas de forma mais detalhada, tentando perceber mais concretamente em que passos das cascatas de sinalização estes fármacos atuam.

7 Referências Bibliográficas

1. Kular, J., et al., *An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level*. Clin Biochem, 2012. 45(12): p. 863-73.
2. Hadjidakis, D.J. and Androulakis, II, *Bone remodeling*. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1092: p. 385-96.
3. Datta, H.K., et al., *The cell biology of bone metabolism*. J Clin Pathol, 2008. 61(5): p. 577-87.
4. Russell, G., et al., *Clinical disorders of bone resorption*. Novartis Found Symp, 2001. 232: p. 251-67; discussion 267-71.
5. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. Nature, 2003. 423(6937): p. 337-42.
6. Zhao, Q., et al., *Osteoclast differentiation and gene regulation*. Front Biosci, 2007. 12: p. 2519-29.
7. Boyce, B.F. and L. Xing, *Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling*. Arch Biochem Biophys, 2008. 473(2): p. 139-46.
8. Robling, A.G., A.B. Castillo, and C.H. Turner, *Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling*. Annu Rev Biomed Eng, 2006. 8: p. 455-98.
9. Raphael Rubin, D.S.S., Emanuel Rubin., ed. *Rubin's Pathology: Clinicopathologic foundations of Medicine*. 6th ed., ed. L.W.a. Wilkins. 2012: Philadelphia.
10. Bilezikian, P.R., G. ; Martin T., in *Principles of Bone Biology*, A. Press, Editor. 2008.
11. Proff, P. and P. Romer, *The molecular mechanism behind bone remodelling: a review*. Clin Oral Investig, 2009. 13(4): p. 355-62.
12. Lamoureux, F., et al., *Proteoglycans: key partners in bone cell biology*. Bioessays, 2007. 29(8): p. 758-71.
13. Clarke, B., *Normal bone anatomy and physiology*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. 3 Suppl 3: p. S131-9.
14. Martin, T.J. and E. Seeman, *Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2008. 22(5): p. 701-22.
15. Frost, H.M., *Cortical bone volume and mass*. Calcif Tissue Res, 1972. 10(3): p. 252-3.
16. Sims, N.A. and J.H. Gooi, *Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption*. Semin Cell Dev Biol, 2008. 19(5): p. 444-51.
17. Burr, D.B., *Targeted and nontargeted remodeling*. Bone, 2002. 30(1): p. 2-4.
18. Available from:
http://lh4.ggpht.com/_RIjx_Mg4ZVM/TKNM_F48PRI/AAAAAAAAAB5A/QJ25S62JO3o/s1600-h/image15.png
19. Mackiewicz, Z., et al., *Bone as a source of organism vitality and regeneration*. Folia Histochem Cytobiol, 2011. 49(4): p. 558-69.
20. Westendorf, J.J., R.A. Kahler, and T.M. Schroeder, *Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases*. Gene, 2004. 341: p. 19-39.
21. Katagiri, T. and N. Takahashi, *Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation*. Oral Dis, 2002. 8(3): p. 147-59.
22. Manolagas, S.C., *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis*. Endocr Rev, 2000. 21(2): p. 115-37.
23. Bonewald, L.F., *The amazing osteocyte*. J Bone Miner Res, 2011. 26(2): p. 229-38.
24. Buo, A.M. and J.P. Stains, *Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells*. FEBS Lett, 2014. 588(8): p. 1315-21.

25. Tatsumi, S., et al., *Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction*. Cell Metab, 2007. 5(6): p. 464-75.
26. Vaananen, H.K. and T. Laitala-Leinonen, *Osteoclast lineage and function*. Arch Biochem Biophys, 2008. 473(2): p. 132-8.
27. Hemingway, F., et al., *In vitro generation of mature human osteoclasts*. Calcif Tissue Int, 2011. 89(5): p. 389-95.
28. Vaananen, H.K., et al., *The cell biology of osteoclast function*. J Cell Sci, 2000. 113 (Pt 3): p. 377-81.
29. Boyce, B.F., *Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions*. J Dent Res, 2013. 92(10): p. 860-7.
30. Edwards, J.R. and G.R. Mundy, *Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models*. Nat Rev Rheumatol, 2011. 7(4): p. 235-43.
31. Reddy, S.V., *Regulatory mechanisms operative in osteoclasts*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2004. 14(4): p. 255-70.
32. Nesbitt, S.A. and M.A. Horton, *Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts*. Science, 1997. 276(5310): p. 266-9.
33. Tolar, J., S.L. Teitelbaum, and P.J. Orchard, *Osteopetrosis*. N Engl J Med, 2004. 351(27): p. 2839-49.
34. Yoshida, H., et al., *The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene*. Nature, 1990. 345(6274): p. 442-4.
35. Takahashi, N., et al., *Deficiency of osteoclasts in osteopetrotic mice is due to a defect in the local microenvironment provided by osteoblastic cells*. Endocrinology, 1991. 128(4): p. 1792-6.
36. Hodge, J.M., M.A. Kirkland, and G.C. Nicholson, *Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis*. J Cell Biochem, 2007. 102(3): p. 759-68.
37. Tanaka, S., et al., *Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast*. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1068: p. 180-6.
38. Dougall, W.C., et al., *RANK is essential for osteoclast and lymph node development*. Genes Dev, 1999. 13(18): p. 2412-24.
39. Wada, T., et al., *RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease*. Trends Mol Med, 2006. 12(1): p. 17-25.
40. Matsuo, K. and N. Irie, *Osteoclast-osteoblast communication*. Arch Biochem Biophys, 2008. 473(2): p. 201-9.
41. Nagy, V. and J.M. Penninger, *The RANKL-RANK Story*. Gerontology, 2015.
42. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell, 1997. 89(2): p. 309-19.
43. Yasuda, H., et al., *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(7): p. 3597-602.
44. Martin, T.J. and N.A. Sims, *RANKL/OPG; Critical role in bone physiology*. Rev Endocr Metab Disord, 2015. 16(2): p. 131-9.
45. Lewiecki, E.M., *New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis*. Nat Rev Rheumatol, 2011. 7(11): p. 631-8.
46. Wagner, E.F. and G. Karsenty, *Genetic control of skeletal development*. Curr Opin Genet Dev, 2001. 11(5): p. 527-32.
47. Cundy, T., et al., *A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype*. Hum Mol Genet, 2002. 11(18): p. 2119-27.
48. Hofbauer, L.C. and M. Schoppet, *Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases*. JAMA, 2004. 292(4): p. 490-5.
49. Zhao, C., et al., *Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis*. Cell Metab, 2006. 4(2): p. 111-21.

50. Lee, S.H., et al., *v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation*. Nat Med, 2006. 12(12): p. 1403-9.
51. Miyamoto, T., *Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion*. Keio J Med, 2011. 60(4): p. 101-5.
52. Bilezikian, P.R., G. ; Martin T., in *Principles of Bone Biology*, A. Press, Editor. 2008.
53. Sims, N.A. and T.J. Martin, *Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit*. Bonekey Rep, 2014. 3: p. 481.
54. Matsuo, K. and N. Otaki, *Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases*. Cell Adh Migr, 2012. 6(2): p. 148-56.
55. Hayman, A.R., et al., *Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis*. Development, 1996. 122(10): p. 3151-62.
56. Roberts, H.C., et al., *Altered collagen in tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-deficient mice: a role for TRAP in bone collagen metabolism*. Calcif Tissue Int, 2007. 80(6): p. 400-10.
57. Allan, E.H., et al., *EphrinB2 regulation by PTH and PTHrP revealed by molecular profiling in differentiating osteoblasts*. J Bone Miner Res, 2008. 23(8): p. 1170-81.
58. Kuroda, Y. and K. Matsuo, *Molecular mechanisms of triggering, amplifying and targeting RANK signaling in osteoclasts*. World J Orthop, 2012. 3(11): p. 167-74.
59. Nakano, H., et al., *TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor*. J Biol Chem, 1996. 271(25): p. 14661-4.
60. Lomaga, M.A., et al., *TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling*. Genes Dev, 1999. 13(8): p. 1015-24.
61. Abu-Amer, Y., *Advances in osteoclast differentiation and function*. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2005. 5(3): p. 347-55.
62. Takayanagi, H., *The role of NFAT in osteoclast formation*. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1116: p. 227-37.
63. Zhao, Q., et al., *NFATc1: functions in osteoclasts*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. 42(5): p. 576-9.
64. Takayanagi, H., et al., *Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts*. Dev Cell, 2002. 3(6): p. 889-901.
65. Takatsuna, H., et al., *Inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis by (-)-DHMEQ, a novel NF-kappaB inhibitor, through downregulation of NFATc1*. J Bone Miner Res, 2005. 20(4): p. 653-62.
66. Asagiri, M. and H. Takayanagi, *The molecular understanding of osteoclast differentiation*. Bone, 2007. 40(2): p. 251-64.
67. Iotsova, V., et al., *Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2*. Nat Med, 1997. 3(11): p. 1285-9.
68. Yamashita, T., et al., *NF-kappaB p50 and p52 regulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1*. J Biol Chem, 2007. 282(25): p. 18245-53.
69. Derijard, B., et al., *JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain*. Cell, 1994. 76(6): p. 1025-37.
70. Schenk, P.W. and B.E. Snar-Jagalska, *Signal perception and transduction: the role of protein kinases*. Biochim Biophys Acta, 1999. 1449(1): p. 1-24.
71. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. 410(6824): p. 37-40.
72. Wada, T. and J.M. Penninger, *Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation*. Oncogene, 2004. 23(16): p. 2838-49.

73. Wagner, E.F., *Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development*. Ann Rheum Dis, 2002. 61 Suppl 2: p. ii40-2.
74. Mansky, K.C., et al., *Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling*. J Biol Chem, 2002. 277(13): p. 11077-83.
75. Ho, D.T., et al., *Interacting JNK-docking sites in MKK7 promote binding and activation of JNK mitogen-activated protein kinases*. J Biol Chem, 2006. 281(19): p. 13169-79.
76. Ikeda, F., et al., *JNK/c-Jun signaling mediates an anti-apoptotic effect of RANKL in osteoclasts*. J Bone Miner Res, 2008. 23(6): p. 907-14.
77. Wei, S., et al., *Interleukin-4 reversibly inhibits osteoclastogenesis via inhibition of NF-kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem, 2002. 277(8): p. 6622-30.
78. Miyazaki, T., et al., *Reciprocal role of ERK and NF-kappaB pathways in survival and activation of osteoclasts*. J Cell Biol, 2000. 148(2): p. 333-42.
79. Nakamura, H., et al., *Role of osteoclast extracellular signal-regulated kinase (ERK) in cell survival and maintenance of cell polarity*. J Bone Miner Res, 2003. 18(7): p. 1198-205.
80. Avioli, L.K., S., *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*. 3rd ed. 1998.
81. Rubin, R.S., D. S., *Rubin's Pathology: Clinocopathologic Foundations of Medicine*. 6 th ed. 2012. 1250-1254.
82. Das, S. and J.C. Crockett, *Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment*. Drug Des Devel Ther, 2013. 7: p. 435-48.
83. Raisz, L.G., *Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects*. J Clin Invest, 2005. 115(12): p. 3318-25.
84. Weitzmann, M.N. and R. Pacifici, *Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale*. J Clin Invest, 2006. 116(5): p. 1186-94.
85. Brincat, S.D., et al., *The role of cytokines in postmenopausal osteoporosis*. Minerva Ginecol, 2014. 66(4): p. 391-407.
86. Pino, A.M., et al., *Concentration of adipogenic and proinflammatory cytokines in the bone marrow supernatant fluid of osteoporotic women*. J Bone Miner Res, 2010. 25(3): p. 492-8.
87. Cauley, J.A., et al., *Inflammatory markers and incident fracture risk in older men and women: the Health Aging and Body Composition Study*. J Bone Miner Res, 2007. 22(7): p. 1088-95.
88. Cenci, S., et al., *Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha*. J Clin Invest, 2000. 106(10): p. 1229-37.
89. Eghbali-Fatourehchi, G., et al., *Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women*. J Clin Invest, 2003. 111(8): p. 1221-30.
90. Hughes, D.E., et al., *Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta*. Nat Med, 1996. 2(10): p. 1132-6.
91. Okman-Kilic, T., *Estrogen Deficiency and Osteoporosis*. Advances in Osteoporosis. 2015.
92. Nagaoka, I., M. Igarashi, and K. Sakamoto, *Biological activities of glucosamine and its related substances*. Adv Food Nutr Res, 2012. 65: p. 337-52.
93. Igarashi, M., K. Sakamoto, and I. Nagaoka, *Effect of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on osteoblastic cell differentiation*. Int J Mol Med, 2011. 28(3): p. 373-9.
94. Kwan Tat, S., et al., *Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence?* Best Pract Res Clin Rheumatol, 2010. 24(1): p. 51-70.
95. Pulsatelli, L., et al., *New findings in osteoarthritis pathogenesis: therapeutic implications*. Ther Adv Chronic Dis, 2013. 4(1): p. 23-43.
96. Sandell, L.J. and T. Aigner, *Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis*. Arthritis Res, 2001. 3(2): p. 107-13.

97. Lorenz, H. and W. Richter, *Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage*. Prog Histochem Cytochem, 2006. 40(3): p. 135-63.
98. Lee, A.S., et al., *A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain*. Gene, 2013. 527(2): p. 440-7.
99. Roman-Blas, J.A. and S.A. Jimenez, *NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. 14(9): p. 839-48.
100. Domagala, F., et al., *Inhibition of interleukin-1beta-induced activation of MEK/ERK pathway and DNA binding of NF-kappaB and AP-1: potential mechanism for Diacerein effects in osteoarthritis*. Biorheology, 2006. 43(3-4): p. 577-87.
101. Ulivi, V., et al., *p38/NF-kB-dependent expression of COX-2 during differentiation and inflammatory response of chondrocytes*. J Cell Biochem, 2008. 104(4): p. 1393-406.
102. Marcu, K.B., et al., *NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA*. Curr Drug Targets, 2010. 11(5): p. 599-613.
103. Goldring, M.B. and S.R. Goldring, *Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis*. Ann N Y Acad Sci, 2010. 1192: p. 230-7.
104. Kapoor, M., et al., *Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2011. 7(1): p. 33-42.
105. Findlay, D.M. and G.J. Atkins, *Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis*. Curr Osteoporos Rep, 2014. 12(1): p. 127-34.
106. Martel-Pelletier, J., S. Kwan Tat, and J.P. Pelletier, *Effects of chondroitin sulfate in the pathophysiology of the osteoarthritic joint: a narrative review*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. 18 Suppl 1: p. S7-11.
107. Rigoglou, S. and A.G. Papavassiliou, *The NF-kappaB signalling pathway in osteoarthritis*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. 45(11): p. 2580-4.
108. Kwan Tat, S., et al., *Modulation of OPG, RANK and RANKL by human chondrocytes and their implication during osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford), 2009. 48(12): p. 1482-90.
109. Upton, A.R., et al., *The expression of RANKL and OPG in the various grades of osteoarthritic cartilage*. Rheumatol Int, 2012. 32(2): p. 535-40.
110. Amin, A.K., et al., *Chondrocyte survival in articular cartilage: the influence of subchondral bone in a bovine model*. J Bone Joint Surg Br, 2009. 91(5): p. 691-9.
111. Kwan Tat, S., et al., *The differential expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts is an indicator of the metabolic state of these disease cells*. Clin Exp Rheumatol, 2008. 26(2): p. 295-304.
112. Russell, A.S., A. Aghazadeh-Habashi, and F. Jamali, *Active ingredient consistency of commercially available glucosamine sulfate products*. J Rheumatol, 2002. 29(11): p. 2407-9.
113. Vista, E.S. and C.S. Lau, *What about supplements for osteoarthritis? A critical and evidenced-based review*. Int J Rheum Dis, 2011. 14(2): p. 152-8.
114. Tapadinhas, M.J., I.C. Rivera, and A.A. Bignamini, *Oral glucosamine sulphate in the management of arthrosis: report on a multi-centre open investigation in Portugal*. Pharmatherapeutica, 1982. 3(3): p. 157-68.
115. Simon, R.R., et al., *A comprehensive review of oral glucosamine use and effects on glucose metabolism in normal and diabetic individuals*. Diabetes Metab Res Rev, 2011. 27(1): p. 14-27.
116. Dostrovsky, N.R., et al., *The effect of glucosamine on glucose metabolism in humans: a systematic review of the literature*. Osteoarthritis Cartilage, 2011. 19(4): p. 375-80.
117. Dahmer, S. and R.M. Schiller, *Glucosamine*. Am Fam Physician, 2008. 78(4): p. 471-6.
118. Sherman, A.L., G. Ojeda-Correal, and J. Mena, *Use of glucosamine and chondroitin in persons with osteoarthritis*. PM R, 2012. 4(5 Suppl): p. S110-6.

119. Aghazadeh-Habashi, A. and F. Jamali, *The glucosamine controversy; a pharmacokinetic issue*. J Pharm Pharm Sci, 2011. 14(2): p. 264-73.
120. Dodge, G.R. and S.A. Jimenez, *Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. 11(6): p. 424-32.
121. Derfoul, A., et al., *Glucosamine promotes chondrogenic phenotype in both chondrocytes and mesenchymal stem cells and inhibits MMP-13 expression and matrix degradation*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. 15(6): p. 646-55.
122. Nishimoto, S., et al., *Effect of chondroitin sulfate and hyaluronic acid on gene expression in a three-dimensional culture of chondrocytes*. J Biosci Bioeng, 2005. 100(1): p. 123-6.
123. Hoffer, L.J., et al., *Sulfate could mediate the therapeutic effect of glucosamine sulfate*. Metabolism, 2001. 50(7): p. 767-70.
124. Varghese, S., et al., *Glucosamine modulates chondrocyte proliferation, matrix synthesis, and gene expression*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. 15(1): p. 59-68.
125. Kim, M.M., et al., *Glucosamine sulfate promotes osteoblastic differentiation of MG-63 cells via anti-inflammatory effect*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. 17(7): p. 1938-42.
126. Monfort, J., et al., *Chondroitin sulfate and hyaluronic acid (500-730 kda) inhibit stromelysin-1 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes*. Drugs Exp Clin Res, 2005. 31(2): p. 71-6.
127. Taniguchi, S., et al., *Long-term oral administration of glucosamine or chondroitin sulfate reduces destruction of cartilage and up-regulation of MMP-3 mRNA in a model of spontaneous osteoarthritis in Hartley guinea pigs*. J Orthop Res, 2012. 30(5): p. 673-8.
128. Tat, S.K., et al., *Chondroitin and glucosamine sulfate in combination decrease the pro-resorptive properties of human osteoarthritis subchondral bone osteoblasts: a basic science study*. Arthritis Res Ther, 2007. 9(6): p. R117.
129. Chan, P.S., et al., *Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. 13(5): p. 387-94.
130. Chan, P.S., J.P. Caron, and M.W. Orth, *Short-term gene expression changes in cartilage explants stimulated with interleukin beta plus glucosamine and chondroitin sulfate*. J Rheumatol, 2006. 33(7): p. 1329-40.
131. Tikku, M.L., et al., *Glucosamine prevents in vitro collagen degradation in chondrocytes by inhibiting advanced lipoxidation reactions and protein oxidation*. Arthritis Res Ther, 2007. 9(4): p. R76.
132. Jomphe, C., et al., *Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2008. 102(1): p. 59-65.
133. Largo, R., et al., *Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. 11(4): p. 290-8.
134. Kapoor, M., et al., *Glucosamine sulfate reduces prostaglandin E(2) production in osteoarthritic chondrocytes through inhibition of microsomal PGE synthase-1*. J Rheumatol, 2012. 39(3): p. 635-44.
135. Uitterlinden, E.J., et al., *Glucosamine decreases expression of anabolic and catabolic genes in human osteoarthritic cartilage explants*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. 14(3): p. 250-7.
136. Ilic, M.Z., B. Martinac, and C.J. Handley, *Effects of long-term exposure to glucosamine and mannosamine on aggrecan degradation in articular cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. 11(8): p. 613-22.
137. Huser, C.A. and M.E. Davies, *Effect of a glucosamine derivative on impact-induced chondrocyte apoptosis in vitro. A preliminary report*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. 16(1): p. 125-8.

138. Caraglia, M., et al., *Alternative therapy of earth elements increases the chondroprotective effects of chondroitin sulfate in mice*. Exp Mol Med, 2005. 37(5): p. 476-81.
139. Poolsup, N., et al., *Glucosamine long-term treatment and the progression of knee osteoarthritis: systematic review of randomized controlled trials*. Ann Pharmacother, 2005. 39(6): p. 1080-7.
140. Towheed, T.E., et al., *Glucosamine therapy for treating osteoarthritis*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(2): p. CD002946.
141. Bruyere, O., et al., *Total joint replacement after glucosamine sulphate treatment in knee osteoarthritis: results of a mean 8-year observation of patients from two previous 3-year, randomised, placebo-controlled trials*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. 16(2): p. 254-60.
142. McAlindon, T., et al., *Effectiveness of glucosamine for symptoms of knee osteoarthritis: results from an internet-based randomized double-blind controlled trial*. Am J Med, 2004. 117(9): p. 643-9.
143. Cibere, J., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled glucosamine discontinuation trial in knee osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2004. 51(5): p. 738-45.
144. Hughes, R. and A. Carr, *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of glucosamine sulphate as an analgesic in osteoarthritis of the knee*. Rheumatology (Oxford), 2002. 41(3): p. 279-84.
145. Miyazaki, T., et al., *Effect of chondroitin sulfate-E on the osteoclastic differentiation of RAW264 cells*. Dent Mater J, 2010. 29(4): p. 403-10.
146. Huang, C.H., et al., *Glucosamine promotes osteogenic differentiation of dental pulp stem cells through modulating the level of the transforming growth factor-beta type I receptor*. J Cell Physiol, 2010. 225(1): p. 140-51.
147. Salbach-Hirsch, J., et al., *Sulfated glycosaminoglycans support osteoblast functions and concurrently suppress osteoclasts*. J Cell Biochem, 2014. 115(6): p. 1101-11.
148. Wildi, L.M., et al., *Chondroitin sulphate reduces both cartilage volume loss and bone marrow lesions in knee osteoarthritis patients starting as early as 6 months after initiation of therapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study using MRI*. Ann Rheum Dis, 2011. 70(6): p. 982-9.
149. Schneiders, W., et al., *In vivo effects of modification of hydroxyapatite/collagen composites with and without chondroitin sulphate on bone remodeling in the sheep tibia*. J Orthop Res, 2009. 27(1): p. 15-21.
150. Ugras, A., et al., *Glucosamine-sulfate on fracture healing*. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, 2013. 19(1): p. 8-12.
151. Guarniero, R., et al., *Avaliação do efeito da glicosamina e condroitina na consolidação de fratura: estudo experimental em ratos*. Revista Brasileira de Ortopedia, 2007. 42: p. 201-205.
152. Persiani, S., et al., *Glucosamine oral bioavailability and plasma pharmacokinetics after increasing doses of crystalline glucosamine sulfate in man*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. 13(12): p. 1041-9.
153. Volpi, N., *Oral bioavailability of chondroitin sulfate (Condrosulf) and its constituents in healthy male volunteers*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. 10(10): p. 768-77.
154. Iozzo, R.V., *Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions*. J Clin Invest, 2001. 108(2): p. 165-7.
155. Bali, J.P., H. Cousse, and E. Neuzil, *Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system*. Semin Arthritis Rheum, 2001. 31(1): p. 58-68.
156. Perrimon, N. and M. Bernfield, *Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes*. Nature, 2000. 404(6779): p. 725-8.
157. Ariyoshi, W., et al., *Heparin inhibits osteoclastic differentiation and function*. J Cell Biochem, 2008. 103(6): p. 1707-17.

158. Shinmyozu, K., et al., *Dermatan sulfate inhibits osteoclast formation by binding to receptor activator of NF-kappa B ligand*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 354(2): p. 447-52.
159. Yamaguchi, K., et al., *Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor*. J Biol Chem, 1998. 273(9): p. 5117-23.
160. Theoleyre, S., et al., *Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and RANK*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. 347(2): p. 460-7.
161. Irie, A., et al., *Heparin enhances osteoclastic bone resorption by inhibiting osteoprotegerin activity*. Bone, 2007. 41(2): p. 165-74.
162. Baud'huin, M., et al., *Glycosaminoglycans inhibit the adherence and the spreading of osteoclasts and their precursors: role in osteoclastogenesis and bone resorption*. Eur J Cell Biol, 2011. 90(1): p. 49-57.
163. Salbach, J., et al., *The effect of the degree of sulfation of glycosaminoglycans on osteoclast function and signaling pathways*. Biomaterials, 2012. 33(33): p. 8418-29.
164. Janckila, A.J. and L.T. Yam, *Biology and clinical significance of tartrate-resistant acid phosphatases: new perspectives on an old enzyme*. Calcif Tissue Int, 2009. 85(6): p. 465-83.
165. Matsumoto, M., et al., *Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)*. J Biol Chem, 2000. 275(40): p. 31155-61.
166. Hotokezaka, H., et al., *U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells*. J Biol Chem, 2002. 277(49): p. 47366-72.
167. Dang, Z.C. and C.W. Lowik, *Differential effects of PD98059 and U0126 on osteogenesis and adipogenesis*. J Cell Biochem, 2004. 92(3): p. 525-33.